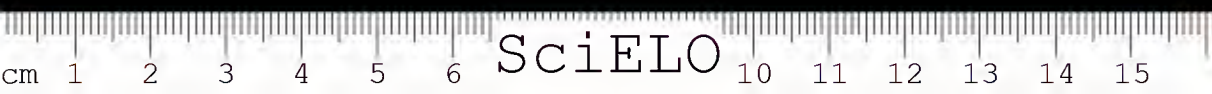
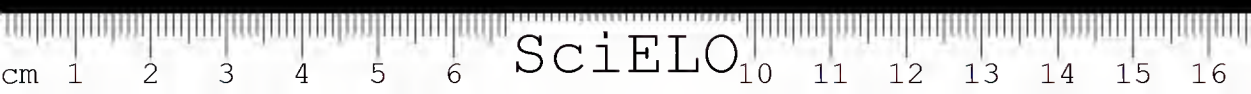
MEMÓRIAS INSTITUTO BUTANTAN

1971

VOLUME 35

SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO BUTANTAN
SÃO PAULO — BRASIL

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

Serão fornecidas separatas dos trabalhos publicados nas "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN", solicitando-se nesse caso o obséquio de enviar outras separatas, em permuta, para a Biblioteca do Instituto.

Tôda a correspondência editorial deve ser dirigida ao:

INSTITUTO BUTANTAN
Biblioteca
Caixa Postal 65
São Paulo — BRASIL

*

MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN

Conteúdo

MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1 — *FINALIDADE*

As MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN são publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores. Tem por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos da Biologia e da Medicina, elaborados por especialistas nacionais ou estrangeiros que se enquadrem no REGULAMENTO DOS TRABALHOS.

2 — *REGULAMENTO DOS TRABALHOS*

2.1 *NORMAS GERAIS*

2.1.1. Os trabalhos devem ser inéditos e destinar-se exclusivamente à revista "MEMÓRAS DO INSTITUTO BUTANTAN". Os artigos serão publicados a convite da Comissão Editorial.

2.1.2. *ESTRUTURA DO TRABALHO*

2.1.2.1 *Elementos preliminares*

a) cabeçalho — título do trabalho e nome do autor (es);

b) filiação científica e enderêço para correspondência.

2.1.2.2 *Texto*

Semprc que possívcl deve obedecer à forma convencional do artigo cicntífico:

a) *Introdução* — Estabclecer com clareza o objetivo do trabalho, relacionando-o com outros do mesmo campo e apresentando de forma sucinta a situação que se encontra o problema investigado. Extensas revisões de literatura devem ser substituidas por referências aos trabalhos mais recentes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

b) *Material e métodos* — A descrição dos métodos usados deve limitar-se ao suficiente para possibilitar ao leitor a perfeita compreensão e repetição dos métodos; as técnicas já descritas em outros trabalhos devem ser referidas sòmente por citação, a menos que tenham sido consideràvelmente modificadas.

c) *Resultados* — Devem ser apresentados com clareza e, sempre que necessário, acompanhados de tabelas e material ilustrativos adequados.

E R R A T A

Pg.VII - "Normas Gerais" - 2.1.1 - onde se lê: MEMÕRAS leia-se MEMÕRIAS

Pg. XI - "EDITORIAL" - 5a.linha - onde se lê: deve-se leia-se deve se

Pg. 1 - § 4 - for Golgi Complex read Golgi complex

Pg. 2 - § 1 - line 7 - for erõthroblast read erythroblast

Pg. 5 - for end read and

for Dibutyl phtalate 1% v/v
Benzoil peroxide 0.05 ml

read
Dibutyl phtalate 0.05 ml
Benzoil peroxide 1% v/v

Pg. 7 - § 4 - line 6 - for identifyed read identified

Pg. 8 - § 1 - line 3 - for Threre read There

Pg. 9 - § 2 - line 4 - for cach read each

Pg.12 - § 2 - line 3 - for polychromatiphilic read polychromatophilic

Pg.15 - § 1 - line 10 - for Skutelsby read Skutelsky

Pg.16 - § 5 - line 14 - for rhytydia read crytydia

Pg.17 - line 2 - for fiblroblasts read fibroblasts

§ 2 - line 3 - for aggress read aggrees

Pg.19 - § 2 - line 1 - for aforemenitioned read aforementioned

Pg.20 - 6 - line 3 - for Laitha read Lajtha

Pg.27 - Fig.16 - for Dye at 1x10 read Dye at $1x10^{-4}$

Pg.36 - line 7 - for HumanErõthropoiesis read Human Erythropoiesis

line 19 - for Etudy read Study

line 22 - for Nuclear-Mitochondria read Nuclear-Mitochondrial

line 23 - for inPelomyxa carolinensis read in Pelomyxa carolinensis

line 35 - for Estrutura read Estruturas

Pg.37 - line 9 - for Eearle's read Earle's

line 21 - for Zelforch read Zellforch

line 46 - for "in vitr" read "in vitro"

line 48 - for Exptl.Cel Res.,:56-59,1963 read Exptl.Cell Res.,5:56-59,1963

Pg.38 - line 5 - for SchWeiz read Schweiz

line 10 - for Fred. read Fed.

line 20 - for LEBLOND,C.P. and Droz,read LEBLOND,C.P.and DROZ,

line 21 - for show read shown; for Procursors read Precursors

line 30 - for Size.....Phenylhydrazine
read Size..... Phenylhydrazine - Induced Reticulocytosis Proc.Soc.Exper.Biol.Med.,57:344-347,1944

line 36 - for 9:228,1960 read 9:248,1960

line 43 - for SCHULTZ,H.UND DE PAOLA read SCHULTZ,H.und DE PAOLA

line 45 - for SENO,S.,HABA,K.,T... read SENO,S. - The Structure and the Function of Reticulocyte.Acta Haem.Jap.21:171-181,1958.

cont.

Pg.38 - line 47 - for SENO,S.,HABA,K.,T. and NAKAMOTO,T.
read SENO,S.,HABA,K.,MAKI,T. and NAKAMOTO,T.

Pg.39 - line 5 - for oes read Does
line 29 - for and Hall,C.E. read and HALL,C.E.

Pg.50 - Leg.Figs.3 e 4 - onde se lê hemogrobina leia-se hemoglobina

Pg.61 - " BIBLIOGRAPHY" - for FRAUMENT,Jr. read FRAUMENI,Jr.

Pg.63 - "INTRODUÇÃO" - 9a. linha - onde se lê "Antes dêle, von Ubisch e Mello,1940, fizeram êsses estudos em animais provenientes diretamente do campo"...
leia-se " Antes dele,von Ubisch e Mello 1940, publicaram algumas observações sobre o ciclo sexual da preá e seu período de gestação. Dellias,1969, e von Ubisch e Mello, 1940, fizeram esses estudos em animais provenientes diretamente do campo"...

Pg.71 - § 2 - 29a.linha - onde se lê ....Rosa e Alvarado,1959)
leia-se ...Rosa e Velardo,1959)

Pg.113 - for narducii or narducci read narduccii

Pg.119 - "DIPLURIDAE,DIPLURINAE" - 3a.linha - onde se lê:D.borgmieri
leia-se :D.borgmeieri

Pg.120 - "BARICHELIDAE,DIPLOTHELINAE" - 2a.linha - onde se lê
N.leonardosi leia-se N.leonardoi

Pg.130 - leg.fig.8 - onde se lê Diplura bitaeniatas
leia-se Diplura bitaeniata

Pg.148 - §4 -line 2 - for show read shown

Pg.152 - §2 -line 1 - for Benzimodazole read Benzimidazole

Pg.153 - §1 -line 1 - for (12) read (2); for dymethylaminopropiophenone
read dimethylaminopropiophenone

cont.

Pg.38 - line 47 - for SENO,S.,HABA,K.,T. and NAKAMOTO,T.
read SENO,S.,HABA,K.,MAKI,T. and NAKAMOTO,T.

Pg.39 - line 5 - for oes read Does
line 29 - for and Hall,C.E. read and HALL,C.E.

Pg.50 - Leg.Figs.3 e 4 - onde se lê hemogrobina leia-se hemoglobina

Pg.61 - " BIBLIOGRAPHY" - for FRAUMENT,Jr. read FRAUMENI,Jr.

Pg.63 - "INTRODUÇÃO" - 9a. linha - onde se lê "Antes dêle, von Ubisch e Mello,1940, fizeram êsses estudos em animais provenientes diretamente do campo"...
leia-se " Antes dele,von Ubisch e Mello 1940, publicaram algumas observaçoẽs sobre o ciclo sexual da preã e seu período de gestação. Dellias,1969, e von Ubisch e Mello, 1940, fizeram esses estudos em animais provenientes diretamente do campo"...

Pg.71 - § 2 - 29a.linha - onde se lê ....Rosa e Alvarado,1959)
leia-se ...Rosa e Velardo,1959)

Pg.113 - for narducii or narducci read narduccii

Pg.119 - "DIPLURIDAE,DIPLURINAE" - 3a.linha - onde se lê:D.borgmieri
leia-se :D.borgmeieri

Pg.120 - "BARICHELIDAE,DIPLOTHELINAE" - 2a.linha - onde se lê
N.leonardosi leia-se N.leonardoi

Pg.130 - leg.fig.8 - onde se lê Diplura bitaeniatas
leia-se Diplura bitaeniata

Pg.148 - §4 -line 2 - for show read shown

Pg.152 - §2 -line 1 - for Benzimodazole read Benzimidazole

Pg.153 - §1 -line 1 - for (12) read (2); for dymethylaminopropiophenone
read dimethylaminopropiophenone

d) *Discussão* — Deve restringir-se à apresentação dos dados obtidos e dos resultados alcançados, relacionando-se novas contribuições aos conhecimentos anteriores. Evitar hipóteses ou generalizações não baseadas nos resultados do trabalho.

e) *Conclusões* — devem ser fundamentadas no texto.

Dependendo do assunto do artigo, as divisões acima poderão ser modificadas de acôrdo com o esquema de trabalho, porém, o artigo deve conter obrigatóriamente:

a) Introdução;

b) Desenvolvimento do tema (com as divisões a critério do autor);

c) Conclusão.

Agradecimentos — devem ser mencionados antes das *Referências Bibliográficas.*

2.1.2.3 *Material de Referência*

Todo trabalho deve vir obrigatòriamente acompanhado de:

a) *RESUMO* — um no mesmo idioma do texto, outro em inglês, redigidos pelo(s) próprio(s) autor(s), devem expressar o conteúdo do artigo, salientando os elementos novos e indicando sua importância. O resumo na língua em que está redigido o trabalho deve ser colocado antes do texto; e o em inglês no final. Só excepcionalmente excederá a 200 palavras. Os títulos dos trabalhos devem ser traduzidos para o inglês.

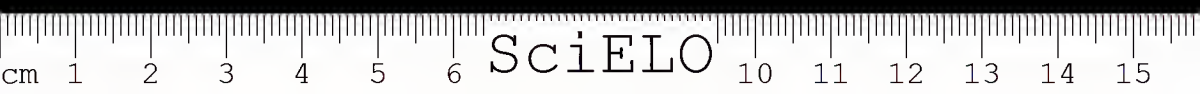
b) *UNITERMOS* — Correspondendo a palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo, devem ser em número necessário para a completa descrição do assunto e assinalados com asteristicos os 3 unitermos principais. Para a escolha dos unitermos usar o vocabulário protótipo do campo especializado. *

c) *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS* — Devem ser incluídas apenas as referências mencionadas no texto e arranjadas em ordem alfabética do sobrenome do autor, numeradas consecutivamente.

Periódico:

AMORIM, M. de F., MELLO, R. F. e SALIBA, F. — Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo experimental comparado das lesões. *Mem. Inst. Butantan, 23*:63, 1950-51.

---

* Para as ciências da saúde usar o "Medical Subject Headings", com tradução em português realizada pelo Grupo de Bibliotecários Biomédicos da A.P.B.

Livro:

BIER, O. — Bacteriologia e imunologia. 1, 13. ed. São Paulo, Melhoramentos, 1966.

As citações no texto devem ser em números índices, correspondendo às respectivas referências bibliográficas.

Exemplos:

As investigações sôbre a fauna flebotomínica no Estado de São Paulo, foram feitas em várias ocasiões [1, 3, 4].

... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[2] (1968).

Referências Bibliográficas (correspondentes aos números índices)

1. BARRETO, M. P. — *Observações sôbre a biologia em condições naturais dos flebótomos do Estado de São Paulo* (Diptera Psychodidae); São Paulo, 1943. (Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

2. DISNEY, R. H. L. — Observations on a zoobosis: leishmaniosis in British Honduras. *J. appl. Ecol., 5*:1-9, 1968.

3. FORATTINI, O. P. — Algumas observações sôbre Biologia dos flebótomos (Diptera, Psychodidae) em região da bacia do Rio Paraná (Brasil). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo, 8*:15-136, 1954.

3. FORATTINI, O. P. — Novas observações sôbre Biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo, 25*:209-15, 1960.

3 — *NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DOS ORIGINAIS*

3.1 — *Datilografia* — Os originais devem ser datilografados, em 3 (três) vias, com espaço duplo, em uma só face, mantendo as margens laterais com 3 cm aproximadamente. Tôdas as páginas devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, no canto superior direito.

3.2 — *Tabelas* — Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas pelo seu título. Os dados apresentados em tabela não devem ser, em geral, repetidos no texto. As notas de rodapé das tabelas devem ser restritas ao mínimo possível e referidas por asteristicos.

3 3 — *Ilustrações* — (fotografias, desenhos, gráficos, etc) — As ilustrações devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como Figuras. Tôdas as figuras serão identificadas fora da área de reprodução com: número, nome do autor, título abreviado do trabalho, indicação da página de texto onde deverão constar. As legendas devem ser apresentadas em fôlhas à parte. As ilustrações devem permitir perfeita reprodução em clichês até a redução mínima de 6,3 cm (largura da coluna do texto). Os desenhos devem ser feitos em papel vegetal e tinta nanquim preta e as letras com normógrafo, nunca datilografadas.

A Revista admite clichês (branco e preto) até 6 do texto, para cada trabalho, devendo os demais serem pagos pelo autor. Para clichês coloridos deverá haver prévia combinação entre a Comissão Editorial e o autor.

De cada trabalho serão tiradas 100 (cem) separatas, devendo o autor pagar as separatas que excedam a êsse número, quando solicitar uma quantidade maior. As separatas em excesso devem ser solicitadas quando o manuscrito fôr encaminhado à Comissão Editorial.

Os trabalhos poderão ser redigidos, além da língua portuguesa, em: inglês, francês e espanhol. Outras línguas ficarão a critério da Comissão Editorial.

A reprodução total ou parcial dos trabalhos em outros periódicos — *com menção obrigatória da fonte* — dependerá de autorização prévia da Comissão Editorial.

Para fins comerciais, será proibida a tradução e reprodução dos trabalhos publicados pela revista.

EDITORIAL

Êste número das "Memórias do Instituto Butantan" assinala uma nova fase na vida funcional deste Instituto, representada pela implantação de uma nova estrutura técnico-científica e administrativa mais complexa, que proporcionou uma hierarquia funcional e melhoria na inter-relação dos diferentes trabalhos. É certo que a atual organização deve-se modificar com o tempo e a experiência, para que ela melhor se adapte às necessidades crescentes do Estado de São Paulo e do Brasil.

Originado em 1898 como dependência do Instituto Bacteriológico, com a finalidade de preparar sôro antipestoso para atender a surto epidêmico de peste bubônica desencadeado na cidade de Santos, foi em 23 de fevereiro de 1901 desligado dessa instituição sanitária tornando-se uma unidade autônoma com o nome de Instituto Butantan.

Já nesta época se aliavam os estudos dos sôros antivenenosos, muito especialmente os antiofídicos, aos trabalhos iniciais de sôros e vacinas contra as moléstias infecciosas em geral. Seu primeiro Diretor e orientador dos trabalhos foi o ilustre cientista e médico brasileiro Vital Brazil Mineiro da Campanha.

Decorridos 70 anos de existência com grandes realizações técnico-científicas, muito especialmente no campo da saúde pública, tendo passado por seus laboratórios uma plêiade de cientistas nacionais e estrangeiros, arrola no presente importantes equipes de trabalhos que se identificam no campo da Imunologia, Biologia, Zoologia muito especialmente relacionada aos animais peçonhentos, Genética, Microbiologia, Patologia, Fisiologia, Farmacologia, Química e Citologia, podendo ser considerado no presente uma das mais complexas e importantes organizações técnico-científicas do Brasil.

Orgão da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, anexo à Coordenadoria de Serviços Técnicos Especializados, tem suas finalidades gerais discriminadas como segue:

- *desenvolver estudos e pesquisas, puras e aplicadas, em qualquer ramo da medicina e biologia, direta ou indiretamente relacionados com a Saúde;*
- *colaborar com os órgãos da Secretaria da Saúde no combate a surtos epidêmicos;*
- *prestar assistência aos órgãos oficiais do Estado no contrôle e na padronização de produtos biológicos;*
- *divulgar suas pesquisas e trabalhos que interessem ao progresso da medicina e biologia;*

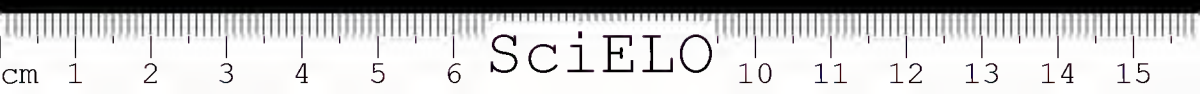
— *realizar missões científicas, tanto no País como no exterior;*

— *promover e colaborar na formação e aperfeiçoamento de pessoal técnico científico de nível médio e superior, do Instituto ou de outras entidades;*

— *fabricar medicamentos e substâncias químicas para uso diagnóstico, profilático ou curativo, estudados ou aperfeiçoados no Instituto Butantan ou ainda, de interêsse especial para os serviços de saúde pública;*

— *facultar à indústria farmacêutica, considerado o interêsse nacional, condições para o seu aperfeiçoamento tecnológico e a realização de pesquisas médicas e farmacológicas.*

Jandyra Planet do Amaral
DIRETORA GERAL

Mem. Inst. Butantan
35: 1-39, 1971.

ERYTHROCYTARY MATURATION IN RODENTS. *

A. BRUNNER JR.
Laboratório de Microscopia Eletrônica
Instituto Butantan

SUMMARY: Erythrocytary series of peripheral rabbit and hamster blood have been studied by methods of hemolysis and thin sections at the ultrastructural level.

The presence of filamentous or rodlike mitochondria, that disintegrate to circular membranous forms, has been demonstrated when hemolysis was done in suspension in distilled water.

After nuclear extrusion, occurring generally in the orthochromatic erythroblast, concomitantly with active contraction and expansions, an increase of mitochondria occurs. This is coincident with the higher intensity of hemoglobin synthesis, as verified by other authors.

Besides the organelles, as mitochondria and polyribosomes, which participate in hemoglobin synthesis, there is the Golgi Complex, probably acting in the reticulocyte water and salts balance during maturation, as well as vesicles and a smooth endoplasmic reticulum.

The final maturation of the erythrocyte is characterized by the increase of hemoglobin concentration followed by a progressive disappearance of all the cytoplasmic structures and the rise of the characteristic discoidal biconcave form, constituted by only an ordinate paracrystalline structure at the molecular level.

UNITERMS: Erythrocytary Maturation.

INTRODUCTION

An accurate study of mammalian erythrocytes shows that the cell during the maturation process, undergoes successive structural and biochemical transformations which confer a functional specificity to it. Theses modifications arise in a cell at the beginning of differentiation, and therefore, without any definitive morphologic and physiologic characteristics. In this respect, erythropoiesis is a very illustrative phenomenon, well known nowadays. Every maturation phase was followed up by the classical staining and cytochemical techniques for optical microscopy. Proerythroblast, the first phase of differentiation, is followed by the basophilic, polychromatophilic and acidophilic erythroblast; the latter gives rise to the non nucleated cell, namely reticulocyte, that develops to the mature erythrocyte.

* Thesis of the doctorate sustained at the Departamento de Fisiologia Geral e Animal of the Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras at the Universidade de São Paulo.

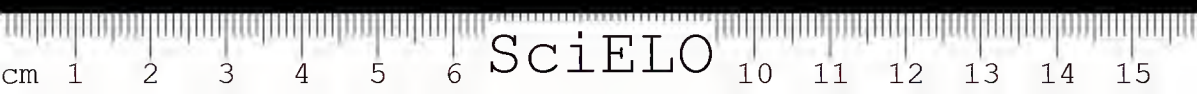
Address:
C.P. 65, São Paulo, Brazil

In animals considered as normal, the transitional phases follow the synchronism law of nucleocytoplasmic evolution, occuring a parallelism between cytoplasmic and nuclear transformations during the maturation of the blood cells; this synchronism did not occur under pathological conditions (Bessis, 1961). In this sequence of evolution, mitosis takes place, followed or not by cytoplasmic division (Berman, 1947; Wolff and Hofe, 1951), and loss of the nucleolus in the basophilic eròthroblast; further, a gradual decrease of basophilia occurs, and hemoglobin synthesis takes place in the polychromatophilic phase; the acidophilic erythroblast shows a marked decrease of nucleoplasmic relationship at the picnotic stage of the nucleus, and a reduction in number of mitochondria that arrange themselves generally near the nucleus. At this phase the nucleus vanishes through cariolysis, carioexis or extrusion, the latter being the more frequent phenomenon (Astaldi et al., 1950; Leonardi, 1951).

Right after this phase, the reticulocyte develops, showing a more intense hemoglobin synthesis in accordance with comparative microspectrophotometric determinations for mature erythrocytes, reticulocytes, erythroblasts and purified hemoglobin, corresponding to the extinction at 4060 Å wave length (Seno, 1953). The immature erythrocyte, or reticulocyte is characterized by granules and filaments at vital or supravital staining with brilliant cresyl blue, Janus green B or other dyes. The nature of the reticulum thus formed has been studied exhaustively by Cesaris-Demel (1907). The granules were denominated A substance, and the filaments, B substance; these structures are known as "Substantia granulo-filamentosa". It has been discussed also whether or not this structure could be an artifact, resulting from the precipitation of the dyes employed. The majority of authors consider "Substantia granulo-filamentosa" as a real artifact on the basis of their experimental results.

Dustin (1947) and Theorell (1950) came to the conclusion that the mammalian reticulocytes contain a diffuse basophilic substance, resulting in a granular agglomeration in the presence of basic dyes. They demonstrated that basophilia is due to the presence of ribonucleoproteins, since this structure is not evidenced after treatment of the reticulocytes with ribonuclease; Burt et al. (1951), and Thoma (1959) confirm these observations. Kosenow (1952), when observing young erythrocytes stained in increasing acridin-orange H-concentrations by fluorescence microscopy, demonstrated an increase of granules and filaments. He concludes, as others do, that this fact is due to the presence of diffuse nucleic acid. Bessis (1954) holds the hipothesis of an artifact due to dye and ribonucleoprotein precipitation, and does not admit the preexistence of the so-called "Substantia granulo-filamentosa".

However, the preexistence of a structure in non stained reticulocytes has been observed through dark field microscopy by Simmel (1926) and Seyfarth (1927), as well as by phase contrast microscopy after hemolysis (Lüdin, 1949), or in intact reticulocytes (Sano, 1965). The nature of this structure and its relationship to the "Substantia granulo-filamentosa" was enlightened by electron microscopy with various techniques (Brunner et al., 1956; Braunsteiner et al., 1956; Vallejo-Freire and Brunner, 1958; Brunner, 1962).

Structures that constitute the Golgi complex, or vesicles and dictyosomes, were observed in normal and lead poisoned guinea-pigs as well as in rabbit embryo erythrocytes. Concentric lamellar structures of unknown function, described for

several kinds of cells, were also observed in reticulocytes (Brunner and Vallejo-Freire, 1964).

Basophilia and all the structures of the reticulocytary phase disappear gradually, giving rise to a mature erythrocyte with the characteristic discoidal and biconcave form that contains only a structure at the molecular level.

In the present work, morphologic aspects of some evolutive phases at the ultrastructural level are analysed, occurring during the maturation of the erythroblast up to the definitive red blood cell. With reference to the above considerations, various questions arise, mainly related to physiology. The following facts are quoted: a — "Substantia granulo-filamentosa" is of essential mitochondrial nature; b — the different aspects of mitochondria, when reticulocytes are hemolysed by different techniques; c) — the quantitative increase of mitochondrial structures after nuclear extrusion; d — in consequence of the former phenomenon, the mechanism that leads to the quantitative increase of mitochondria, as well as the degenerating process of these organelles; e — the components of the Golgi complex in the young erythrocytes; f — the possible existence of a molecular arrangement in the normal mature erythrocyte.

MATERIAL AND METHODS

Guinea-pigs (*Cavia porcellus*) weighing 350-400 g, newborn rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), rabbit and hamster embryos (*Mesocricetus auratus*), 16-22 and 10 days old, respectively, were used.

Bleeding anemia in guinea-pigs.

To increase the number of reticulocytes in blood, 5 to 6 ml of blood were withdrawn daily by cardiac punction during 5 days; 2-3 days after the last bleeding, blood was collected for examination. The Giemsa stained smears show reticulocytes recognized by their diffuse basophilia, with a percentage varying between 10 and 15%.

Lead poisoning anemia in guinea-pigs.

One ml of an 1% aqueous lead acetate solution was injected subcutaneously during 3 to 9 days. Blood was withdrawn by cardiac punction after 3-7 days. Reticulocytosis varied from 6 to 50%, and the proportion of erythroblasts was about 6%.

Blood samples with reticulocytosis and erythroblastosis.

Blood samples of newborn rabbits were obtained by cardiac puncture; from hamster and rabbit embryos, by sectioning the umbilical cord. Embryonic blood consists merely of megaloblasts, megalocytes, erythroblasts and reticulocytes; the percentage of reticulocytes is about 20% in newborn rabbits; erythroblasts are rarely found in the peripheral blood.

Hemolysis.

Technique A — Thin blood smears were prepared on collodion-coated histological slides and allowed to dry at room temperature for 5-10 hs, and hemolysis

was performed in 0.8% NaCl solution containing 2.5% formalin. The stromas were then stained for 5-10 min 1% aqueous phosphotungstic acid solution, pH about 3.5, washed in distilled water and dried at room temperature. The films, carrying the stromas, were transferred to metal grids for examination (Brunner and Vallejo-Freire, 1956).

Technique B — One ml of blood was washed once in 0.85% NaCl solution and hemolysed in 20 ml distilled water.

Technique C — Washed blood was hemolysed in 20 ml of 0.2% NaCl solution containing 2.5% formalin.

In the latter two instances, 2 ml of a 2% O_sO_4 aqueous solution were added to the samples after hemolysis. After 5 min the ghosts, or stromas, were centrifuged at 60 g for hemoglobin elimination, and washed three times in distilled water; the sediment was suspended in 4 or 5 ml of distilled water and then dropped over collodion-coated metal grids. After 50 or 60 min the excess of water was absorbed with filter paper, and the preparations air dried at room temperature (Brunner and Vallejo-Freire, 1956).

Replica

To investigate the existence of structures on the erythroblast nucleus, blood smears were fixed with O_sO_4 vapor for 1 h, and then covered with a 1% collodion amyl acetate solution, and tilted at an angle of about 50° to the horizontal, for 30 min. After drying, the replicas were detached from the smears and transferred to metal grids.

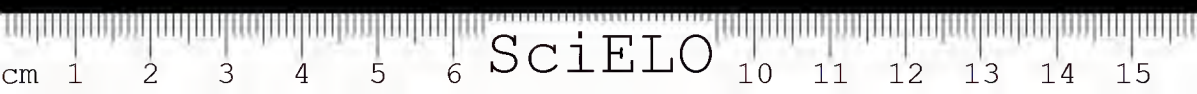
Treatment with ribonuclease

Smears hemolysed according to technique A, without staining, were kept in a M/7 veronal-acetate buffer, pH 6.8, containing 0.1% ribonuclease (General Biochemical Inc) at 37°C for 1 h; controls were treated under the same conditions. All smears were washed in distilled water and stained for 5 to 10 min in an 1% aqueous phosphotungstic acid solution. After washing and drying the films with the adhering stromas or ghosts were transferred to metal grids.

Most of all these preparations were submitted to the shadow-casting process, with chromium or palladium.

Retraction of the inner erythrocyte material by osmic acid.

Peripheral blood erythrocytes of normal guinea-pigs were fixed for 18 to 20 h in NaCl solutions of concentrations varying between 0.60 and 0.40%, containing 10% formalin. Part of each suspension was centrifuged at 60 g and the sediments suspended or not in 1% aqueous phosphotungstic acid solution for 15 min; the remaining part of each suspension was centrifuged and the sediments suspended in 1% aqueous osmic acid solution for 15 min.

The erythrocytes treated with phosphotungstic or osmic acid were, after dehydration, embedded in methyl and butyl-methacrylates, and ultrathin sections prepared for examination.

Supravital staining with Janus green B.

Reticulocytes of guinea-pings with bleeding anemia, were stained with Janus green B, adding 2 or 3 blood drops to 3 or 4 ml of 0.85% NaCl in a series of dye dilutions from $1x10^{-4}$ to $5x10^{-6}$. After 5 min, and when the staining at the $1x10^{-4}$ dilution is microscopically visualized, the erythrocyte suspensions were centrifuged at 60 g, and the sediments suspended in an 1% osmic acid solution in veronal-acetate buffer of 7.4 pH. For fixation of the dye, and to increase the contrast at the electron microscope, an equal volume of an aqueous solution, containing 3.0% $HgCl_2$ and 5.6% KI was added to the suspension after 5 min, according to the technique of Seno et al. (1958). After washing in distilled water, the erythrocytes were dehydrated in alcoholic series; the passages should be as short as possible because the Janus green B-dye fixative complex is soluble in alcohol.

Fixation end embedding techniques for ultrathin sectioning.

A few blood drops of rabbit and hamster embryos were added to an 1% $KMnO_4$ solution in veronal-acetate buffer, pH 7.4. After 5 min the suspension was centrifuged at 60 g for 10 min, the supernatant discarded, and the sediment suspended in an 1% O_sO_4 solution in "Subtosan" or veronal-acetate buffer for 10 min. Blood of normal and lead acetate treated guinea-pigs was fixed only in an 1% O_sO_4 solution in veronal-acetate buffer, pH 7.4, for 15-20 min. Erythrocytes embedded in a 3:7 methyl and butyl methacrylate mixture, containing 1% benzoil peroxide, were dehydrated in alcoholic series; embeddings prepared in Epon 812+, and in Crystic-araldite++ were firstly dehydrated in acetone series, or when dehydrated in alcoholic series, they were finished in 100% acetone. The time allowed for erythrocytes in each dehydrant medium was about 15 min, and passages from one medium to another were made by successive centrifugations up to the final embeddings.

Sections were cut in a Porter-Blum microtome with glass knives, and harvested on collodion or carbon-coated metal grids. To increase the contrast of the sections of Epon or Crystic-araldite inclusions, lead citrate staining was employed, according to the procedure of Reynolds (1963).

\+ Epon mixture (Luft, J., 1961), modified

Epon 812	5.3	ml
DDSA	2.0	ml
NMA	3.8	ml
DMP-30	2%	$^v/_v$

++ Crystic-araldite mixture (Weigl, D.R. and Kisielius, J.J., 1967)

Crystic 196	7.5	ml
Araldite	2.5	ml
Dibutyl phtalate	1%	$^v/_v$
Benzoil peroxide	0.05	ml

Comparative study of the number and area of mitochondria in immature erythrocytes.

The criterion adopted in the computation of sectioned cells or from hemolysed smears, to determine the total mitochondrial area per early reticulocytes, and erythroblasts, is based on the following facts: 1 — The reticulocyte loses gradually the mitochondria as it develops into the mature erythrocyte; 2 — in an immature erythrocyte population exist, therefore, besides erythroblasts, reticulocytes of any maturation phase, from that containing the highest number of mitochondria to the end phase of evolution. In each preparation, only cells showing the highest number of mitochondria have been considered, to verify whether the early reticulocytes actually contain a higher number of those organelles than the erythroblasts. The values obtained for mitochondrial areas in thin sections of nucleated and non nucleated erythrocytes in relation to the respective frequencies of the erythrocytes, considered in this work, were graphically represented.

Determination of the mitochondrial areas in sections or after hemolysis of the smears.

The areas are estimated from the weight of the mitochondria, cut out from the photographic paper used for the copies or enlargements of the negatives, with relation to the medium paper weight per area unit. The total mitocondrial area per erythrocyte was converted to μ^2.

The preparations were examined and photographed with the Siemens ÜM 100 b and Elmiskop I electron microscopes of the Instituto Butantan. The magnifications were from x 1200 to x 20000; an acceleration potencial of 60 KV was applied.

RESULTS

There are no morphological differences between erythroblasts, reticulocytes, and erythrocytes of guinea-pigs, rabbits and hamsters, except for those guinea-pigs with lead acetate intoxication, whose immature erythrocytes present mitochondria much larger than the ones of normal animals.

Blood of hamster and rabbit embryos obtained from the umbilical cord, and examined in Giemsa-stained smears, contains besides erythroblasts, 10 to 15% of megaloblasts; no mitosis occurs in the blood of 18 to 19-days old rabbit embryos; in the embryos of 16 days, only two mitoses could be observed.

In peripheric blood of lead poisoned guinea-pigs with an aproximately 50% reticulocytosis, and a 5-6% erythroblastosis, only a few basophilic erythroblasts were found.

Megaloblasts are easily distinguished from erythroblasts by their much larger diameter, and by the small nucleus, generally located at the center of the cells; reticulocytes are readily distinguished by the electron dense reticulum at different stages, and by the absence of a nucleus (Figs. 1 and 2).

Erythroblasts

Hemolysed smears prepared in accordance with technique A, show erythroblasts with a fine membrane, containing large electron dense filaments and gra-

nules. The nucleus, larger than that of megaloblasts, are of irregular periphery (Fig. 3), sometimes located at an excentrical position, probably during the extrusion phase.

Erythroblasts, when hemolysed in suspension in distilled water without partial drying, according to technique B, present granules and circular forms within the folded membrane. Under those conditions of hemolysis, no filaments nor rods have been observed. Their irregular nucleus may be found at the center or at the periphery of the stroma (Fig. 4). The same structures are also found in the subsequent evolutive reticulocytary phase, where a more detailed analysis has been done.

Ultrathin cell sections undergo less drastic treatment, and are integrally analysed without any hemolytic procedure. Megaloblasts contain a more electron dense cytoplasm as compared to erythroblasts, with several mitochondria, vesicles and endoplasmic reticulum. The nucleus is small and heterogeneous (Fig. 5).

Only one mitotic figure was observed in hundreds of preparations of ultrathin rabbit and hamster embryo sections. Fig. 6 shows a possibly basophilic erythroblast in mitosis, corresponding to an intermediary phase between prophase and metaphase; the double nuclear membrane shows large gaps at several regions with a mitochondrion at one of the extremities; the other organelles dispose themselves close to the membranes. Chromosomes are less electron dense than cytoplasm, and apparently individualized. The cell shows an irregular configuration, probably due to protoplasmic movements, ocurring during mitosis.

The erythroblast in Fig. 7 is constituted by an electron dense cytoplasm, compared to other types of cells, because at this stage it contains already synthesized hemoglobin. Some sections show mitochondria of about 0.3 μ in diameter, disposed near the agranular endoplasmic reticulum. This structure is sometimes associated with the Golgi complex. In other cytoplasmic regions there is a fine, dense granulation, identifyed as ferritin, enclosed in a membrane; these granulations may agglomerate to form masses of about 0.03 to 0.1 μ, situated between double membranes of mitochondrial nature. The ferritin granules may also be aligned, forming parallels as if corresponding to the mitochondrial lamellar structure (Fig. 8). The nucleus (Fig. 7), generally less electron dense, presents however, regions similar in density to the cytoplasm; it is limited by a double membrane that shows small pores.

At the acidophilic maturation phase that precedes that of nuclear extrusion, the cell shows an irregular configuration, and a homogeneously dense excentric nucleus limited by a double membrane, generally without pores. Cytoplasmic contractions and expansions are observed at a more advanced evolutive phase, giving rise to several lobes, one of which contains the nucleus. At this stage of development the proximity of mitochondria is commonly noted near the nuclear membrane (Fig. 9).

Reticulocyte

Well-marked cytoplasmic contraction and expansion movements persist still in the earlier reticulocyte after the extrusion of the erythroblast nucleus (Fig. 10). This reticulocyte from lead poisoned guinea-pigs, shows mitochondria with dia-

meters of about 0.90 μ, corresponding on the average to three times the diameter of mitochondria in normal animal reticulocytes; the internal membrane, as well as the lamellas, are disrupted.

This anucleated, basophilic, and therefore immature erythrocyte presents the same structures already described for erythroblasts, when hemolysed according to the three techniques. Threre are differences, however, as to quantity, of large filaments or circular forms, according to technique A or B, respectively. The recently constituted reticulocytes present large filaments and rods in a higher number and length (technique A) than the erythroblasts; also the number of circular forms is higher in less evolved reticulocytes, in conformity to technique B for hemolysis in suspension in distilled water, as will be seen later.

The large filaments may attain 10 μ in length, or more, and show diameters ranging from 0.20 to 0.30μ; generally, they are continuous to an irregular region of the same density. Their extremely variable dispositions present a radial, convoluted or undefined configuration (Fig. 11). There are diffusively distributed granules, ranging from 0.10 to 0.15 μ in diameter, which may appear in a large number, exceeding sometimes one hundred; these granules disintegrate through treatment with ribonuclease under the above exposed conditions. In erythrocytes slightly shadowcasted, thin filaments are clearly visible whose extremities maintain contact with the border of the stroma, and apparently with the large filaments too (Fig. 12).

Reticulocytes of lead poisoned animals show the same structures; the large filaments, however, have diameters of about 0.75 μ (Fig. 13), corresponding, on the average, to three times that observed in normal animals.

When reticulocytes are supravitally stained with Janus green B at dilutions from $1x10^{-4}$ to $5x10^{-6}$ in physiologic saline, and hemolysed in partially dried smears, according to technique A, they show large and irregular filamentous structures of accentuated electron density; thin filaments and granules are not visible at low dilutions (Fig. 14). At higher dilution of Janus green B, these immature erythrocytes show clearly all the structures (Fig. 15). Through ultrathin sections, reticulocytes stained with dye at dilutions of $1x10^{-4}$, show well contrasted mitochondria due to mercuric chloride and potassium iodide, that form a dense complex with the dye within these organelles, close to the internal membranous structures, thus reducing the intertrabecular space; this complex is also near the agglomeration of granules from 100 to 150 Å, and the enlarged endoplasmic reticulum (Fig. 16); the controls show reticulocytes with the same structural aspects as unstained cells, when submitted to the same treatment.

Reticulocytes from blood hemolysed in suspension in distilled water (technique B) contain circular forms from 0.3 to 1.0 μ as well as granules from 0.15 to 0.20 μ (Fig. 17). In these preparations, no large nor thin filaments were found. When reticulocytes have been hemolysed in hypotonic NaCl and formalin (technique C), they show forms similar to the circular ones, but not individualized; granules are also present in these red cells (Fig. 18). Ultrathin sections of these erythrocytes show that mitochondria became volumous, presenting sections of about 0.08 μ, as in Fig. 19; this initially filamentous mitochondrion shows several constrictions, due to osmotic changes.

The ultrathin sections of intact blood present reticulocytes of less electron density than the mature erythrocyte. This fact is due to the lower hemoglobin concentration in immature cells. A varying number of mitochondria is found in transverse, oblique or longitudinal sections of rods and filamentous forms; sections of greater diameters measure up to 0.35 μ in normal material. Transverse and longitudinal sections from the agranular endoplasmic reticulum were observed. The diameter of these canaliculated systems are of about 0.07 μ (Fig. 20); this reticulum is continuous to the plasmic membrane as in other kinds of cells, existing however, temporarily in reticulocytes (Fig. 21); frequently a relation of proximity to the mitochondria is observed (Figs. 7 and 20). Some cells show membranous structures, constituting the dictyosomes and vesicles of the Golgi complex as in Fig. 22; the distance between the membranes is of approximately 0.02 μ.

Quantitative considerations on erythroblast and reticulocyte structures.

Through hemolysis by technique A, structures of erythroblasts and reticulocytes may be observed integrally, thus providing a more suitable way for comparative studies on the quantity of these structural elements within these cells. In each preparation, only cells with a higher number of large filaments were taken into account, considering that they diminish gradually during the reticulocyte maturation phase. By using technique A for hemolysis of partially dried smears, we observed that the quantity of large filaments with respect to number and extension, is higher in reticulocytes than in erythroblasts. These structures of erythroblasts with excentric nucleus may present areas of about 8.5 μ^2 (Fig. 23); in erythroblasts with the nucleus already in the extrusion phase, the area of filaments and rods decreases considerably (Fig. 24), and a value of 3.6 μ^2 was found. The newly constituted reticulocytes show an increase of large filaments, attaining twice the above values, taking into account only the areas of erythroblasts still containing an excentric nucleus; the anucleated erythrocytes of Figs. 25, 26, 27, and 28 show areas of 8.6, 12.7, 16.7, and 17.2 μ^2, respectively. These cells are still of an irregular shape due to protoplasmic movements that occur during the extrusion of the nucleus at the late evolutive erythroblastic phase.

The immature erythrocytes, hemolysed in suspension in distilled water, according to technique B, show also a higher number of circular forms in the reticulocytes when compared with erythroblasts (Figs. 29 and 30).

By the ultrathin sectioning method a confrontation was performed based on statistical values, whereas the presence of a higher or a smaller number of mitochondria depends on the level of the sections as well as on the evolutive erythrocytary stage, since mature red blood cells are destitute of any structure. Hence, in each preparation only erythroblasts and reticulocytes with a higher number of mitochondria were considered.

Determinations were done in 138 erythroblasts and 191 reticulocytes, and the percentual frequency of cells were listed in the Table; the mitochondrial area per cell has been converted into μ^2 with interval of 0.1 μ^2 and represented in the histogram of Fig 31.

Erithroblasts — 138		Reticulocytes — 191		
E B	%	Mitoch. área/cell (μ^2)	R C	%
14	10.1	0.0 —— 0.1	1	0.5
34	24.6	0.1 —— 0.2	4	2.1
32	23.9	0.2 —— 0.3	3	1.6
20	14.5	0.3 —— 0.4	13	6.7
18	13.0	0.4 —— 0.5	18	9.4
7	5.1	0.5 —— 0.6	19	10.1
5	3.6	0.6 —— 0.7	15	7.9
4	2.9	0.7 —— 0.8	17	8.9
4	2.9	0.8 —— 0.9	21	11.0
		0.9 —— 1.0	23	12.1
		1.0 —— 1.1	10	5.2
		1.1 —— 1.2	9	4.7
		1.2 —— 1.3	8	4.2
		1.3 —— 1.4	5	2.6
		1.4 —— 1.5	6	3.2
		1.5 —— 1.6	7	3.6
		1.6 —— 1.7	3	1.6
		1.7 —— 1.8	1	0.5
		1.8 —— 1.9	1	0.5
		1.9 —— 2.0	1	0.5
		2.0 —— 2.1	2	1.0
		2.1 —— 2.2	2	1.0
		2.2 —— 2.3	0	—
		2.3 —— 2.4	0	—
		2.4 —— 2.5	0	—
		2.5 —— 2.6	0	—
		2.6 —— 2.7	1	0.5
		2.7 —— 2.8	0	—
		2.8 —— 2.9	1	0.5

TABLE

Genesis and disappearance of mitochondria.

These aspects were only observed in a few reticulocytes. Several sections show mitochondrial structures apparently in formation (Figs. 32 and 33). A possible canalicular system, sectioned longitudinally, shows two parallel and convoluted membranes (Fig. 34), and it seems that the inner membrane of the whole gives rise to a double lamella by invagination; the external one may constitute the limiting membrane of a newly formed mitochondrion. A relationship between canalicules and partially formed mitochondria is well suggestive in Figs. 35 and 36. More complex inner structures of mitochondria, resulting from bifurcations or bilateral expansions of the double lamellas, were also observed.

Several aspects of mitochondrial structures, suggesting a gradual breakdown, were also found in some reticulocytes (Figs. 37 and 38). Mitochondria lose the external limiting membrane, then the internal one; finally, only double lamellas, or traces of them, are seen.

Erythrocyte.

This final stage of the evolutive erythrocytary process in characterized by its structural simplicity at the cytological level. Through the techniques A, B, or C, for osmotic hemolysis, only the remnants of the folded plasmic membrane, namely stroma, can be observed.

When red cells are fixed integrally by formalin in hypotonic saline, and embedded as above described for ultrathin sectioning, their transversal sections show biconcave forms of enlarged diameters due to osmotic changes, provoked under these conditions; these sections show electron dense granules attached one to another by thin, more or less long filaments. As a whole these elements give an aspect of an irregular meshwork with the larger and more agglomerated granules concentrated at the periphery (Figs. 39 and 40).

If erythrocytes fixed by formalin in hypotonic saline are suspended in an aqueous ormic acid solution before dehydration, they present biconcave forms, but now compact, and therefore with a high electron density and normal dimensions, as if fixed by formalin or osmic acid in an isotonic medium. This is due to a retraction of the inner components of the erythrocytes; the membrane, or stroma, remains expanded and partially detached from the erythrocytary content. Three dimensionally this membrane constitutes large sacs, enclosing the retracted material (Figs. 41 and 42).

In some erythrocytes, partially hemolysed by disruption of the membrane during manipulation previous to treatment with osmic acid, no such phenomenon has been observed.

DISCUSSION

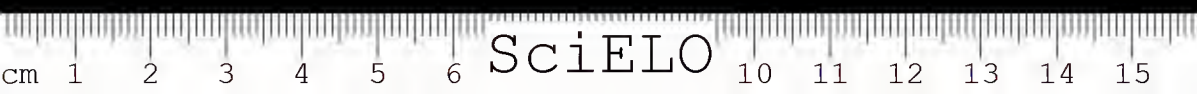
In this study, cytologically less heterogeneous material has been used, closely related to other investigations on the isolation of a possible intrinsic maturation factor in cells of the erythrocytary series. Peripheral blood of anemic animals or

embroyonic blood is a more adequate material than bone marrow or erythropoietic liver. Early embryonic blood is also favorable since leuco — and thrombocytopoiesis does not occur at this uterine growth stage. Lead poisoned animals present a much longer maturation period in the erythrocytary series, according to Seno et al. (1953), thus allowing the detection of all structures from active phases to disappearance.

Structures observed after hemolysis.

The blood of embryos hemolysed in partially dried smears (tecnique A), allows an observation of at least three elements, relatively preserved as a whole, common to megaloblasts, erythroblasts and reticulocytes: granules that correspond to the polyribosomes, large filaments or rods, and thin filaments well defined in Figs. 2, 12, 13, and 15, constituting the agranular endoplasmic reticulum, better examined in ultrathin sections. The large filaments are identified as mitochondria in accordance with the following facts: 1 — they are stainable with ferric hematoxylin and acid fucsin for mitochondrial evidence by the methods of Regaud and Altmann, respectively; 2 — they decrease quantitatively as the reticulocyte develops to a mature erythrocyte, the same ocuring with mitochondria; 3 — in erythroblasts as well as in reticulocytes of lead poisoned animals, they increase in diameter, on the average, about three times that of normal animals, comparing Fig. 13 with others; the same enlargement is observed in mitochondria as seen in Fig. 10 in comparison with Fig. 20 of normal animal reticulocyte (Vallejo-Freire and Brunner. 1958); 4 — they are morphologically comparable with the mitochondria in fibroblasts from tissue culture medium examined as a whole (Porter, 1953); 5 — they increase in size when in contact with a hypotonic medium (Brunner and Vallejo-Freire, 1956); the same occurs with mitochondria as observed by Lewis and Lewis (1915), Zollinger (1948), and Vallejo-Freire and Brunner (1958).

Partial drying of the smears preserves relatively the large filaments or mitochondria without coagulation of the hemoglobin, now existent in the polychromatiphilic erythroblasts, thus allowing hemolysis (technique A); when hemolysis is performed in suspension in distilled water (tecnique B), the mitochondria increase in size up to disintegration, resulting circular forms (Figs. 4, 17, 29, and 30) as observed by Bernhard et al. (1949). Intermediary forms may be obtained when hemolysis is performed according to technique C, in a less hypotonic medium containing formalin (Fig. 18). These structures can be observed in sections, as in the reticulocyte shown in Fig. 19, whose inicially filamentous mitochondrion increased in size, consequently giving rise to sectors limited through constrictions. The disruption of these membranous septa gives origin to circular forms constituted by the limiting mitochondrial membrane, traces of the inner membrane and double lamellas.

Reticulocyte granules, ranging from 0.10 to 0.15 μ, clearly visible in Figs. 11, 12, 17, and 18, did not change morphologically when hemolysed by any one of the three techniques, A, B, or C. Each granule is morphologically similar to the polyribosomes described by Warner et al. (1962) as tetra, penta, and hexamerous forms, from lysed reticulocytes, constituting the site of globin synthesis. These granules disintegrate partially when treated with ribonuclease; remnants

possibly represent the proteic part of the ribosomes. In reticulocytes stained with Janus green B, these granulations precipitate with the dye, as will be shown later.

Mitochondria and "Substantia granulo-filamentosa"

Our observations on reticulocytes treated with Janus green B agree with those of Kosenow (1952) which refer to the concentrations of the dye used. In reticulocytes treated with a $1x10^{-4}$ dilution, the structures are detected with some difficulty at optical microscopy. Figure 14 shows a reticulocyte supravitally stained with this dilution, and hemolysed according to technique A, where only a single, long and pronounced electron dense structure can be observed. In these preparations the large filaments or mitochondria, the polyribosomic granules and the thin filaments or endoplasmic reticulum, agglomerate with the dye. Reticulocytes treated with higher dilutions, e.g., $5x10^{-6}$, show clearly all those structures, independent one of each other (Fig. 15). Ultrathin sections of the stained reticulocytes show mitochondria of increased contrast after $HgCl_2$ and KI fixation. The membranes, mainly the double lamellas are thicker than in controls, reducing therefore the intertrabecular space (Fig. 16). Surrounding these mitochondria, sections of the enlarged endoplasmic reticulum and agglomerated particles were found, identified as ribosomes by their density and dimension.

Lazarow and Cooperstein (1953) suggest that the cytochomoxidase system takes part in the staining of mitochondria with Janus green B; this enzymatic system is probably responsible for the specificity of this staining. Rubinstein et al. (1956) determined cytochromoxidase in the mitochondrial fraction of rabbit reticulocytes.

Mitochondria are the predominant structural elements in immature erythrocytes; they may therefore be regarded as the essential component of the "Substantia granulo-filamentosa" in those cells stained with Janus green B, considering that the dye fixes itself within the mitochondria, and that the resultant ribonucleoprotein precipitate surrounds these organelles. Thus, a pre-existent structure is indirectly evidenced at the optical microscope. The concept of "Substantia granulo-filamentosa" is restricted merely to the mitochondria of unstained reticulocytes, only hemolysed after partial drying of the smears.

Observations on some evolutive phases.

The embryonic, megaloblastic, or primordial erythroblastic series are distinguishable from the definitive or secondary erythroblastic series through their cells of larger dimension, contain hemoglobin in higher concentration, even at the nucleated phases (Fig. 5). In comparison with the definitive erythroblasts there is an evolutive cytoplasmic anticipation in relation to the nucleus.

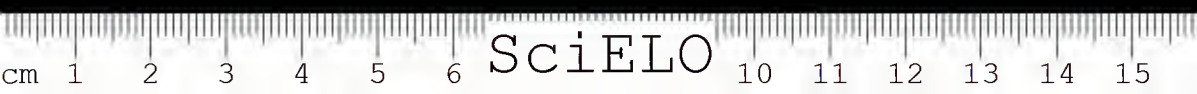
According to Jolly (1923) the definitive erythroblasts arise in 14-day rabbit embryos. In spite of a low mitosis frequency, and the reduced examination field at the electron microscope, a possible basophilic erythroblast has been detected, showing a mitotic figure at an intermediary phase between prophase and metaphase. In this latter stage, the nuclear membrane disappears, and the individualized chromosomes arrange themselves at the equatorial region of the cell. Fig. 6 shows

a nuclear membrane with long interruptions, and at one point, one mitochondrion arrange itself close to one of the extremities of this membrane. The well defined chromosomes, as a morphological entity, are less electron dense than cytoplasm, and apparently will dispose themselves at the equatorial region of the erythroblast. These dislocations are accompanied by cytoplasmic movements which confer to the cell an irregular configuration.

The erythroblast in Fig. 7, more frequently observed in the preparations, may be considered as polychromatophilic due to its relative dense cytoplasm, containing now synthesized hemoglobin. Some of the mitochondria arrange themselves close to the endoplasmic reticulum whose function probably consists in conducting material between those organelles and blood plasma. Fig. 21 shows a reticulocyte whose plasmic membrane is continuous with the endoplasmic reticulum, constituting a pore of about 180 Å. These pores exist only temporarily and disappear during maturation.

In some hypochromic anemias, morphological aspects of hemoglobin biosynthesis is easier to be detected because of the slowness or interruption of the process in which iron, originating from the reticular cells, participates in the formation of the heme prostetic group. Using this material, Bessis and Breton-Gorius (1957) detected part of the iron cycle through electron microscopy, from its incorporation into the erythroblast, as ferritin, its allocation in mitochondria at the intertrabecular space, to finally, its dispersion in the cytoplasm in form of fine grains, by disruption of the mitochondrial membranes. Rimington (1957) attained from a suspension of liver cell mitochondria, some stages of hemoglobin biosynthesis. In normal, immature red cells, these enzymatic reactions are rapid; it is, therefore, difficult to detect some of these aspects at the electron microscope. Fig. 8 shows a fine ferritin granulation disposed between membranes of mitochondrial nature. The mitochondria decrease quantitatively up to the acidophilic stage of erythroblasts, as observed by Sorensen (1960) and confirmed by our observations. However, these organelles increase in number in the less evolutive phase of reticulocytes, as shown by comparative examinations.

The nucleus of erythroblasts (Fig. 7) is heterogenously electron dense, presenting regions of the same density as the cytoplasm. This material is often continuous to the cytoplasm through pores of the double nuclear membrane, a fact also verified by Grasso et al. (1962), and Skutelsky and Danon (1967) in mouse erythroblasts. Simpson and Kling (1967) reported the same fact for dog erythroblasts, and suggested the presence of hemoglobin in the nucleus. The same observation was also described in amphibian erythroblasts, where the nuclear hemoglobin arranges itself in a paracrystalline form, an arrangement not suggested for cytoplasmic hemoglobin (Fawcet and Witebsky, 1964). Through cytochemical reactions and absorption determinations at a wave length of 4047 Å in human and rat erythrocytes, Carvalho (1953) suggested the presence of the heme group in the nucleus. Davies came to the same conclusion through measurements with the same wave length and by electron microscopy of bird and amphibian erythroblasts.

A few hamster erythroblasts showed a less electron dense material extruded from the nucleus into the cytoplasm. According to Simpson and Kling (1967) this Feulgen positive material could be the result of a karyolytic process, giving rise

to Jolly bodies. Summarizing, there exist in the nucleocytoplasmic relationship of erythroblasts, intranuclear regions of the same electron density as in cytoplasm, which absorb wave lengths of 4047 Å, corresponding, therefore, to the heme group, and sometimes less electron dense cytoplasmic regions, deriving from the nucleus and containing desoxiribonucleic acid.

At the beginning of the extrusion process the erythroblast shows active contraction and expansion movements, and the nucleus disposes itself excentrically up to its location within a cytoplasmic lobe (Fig. 9). These movements have been studied through microcinematography by Comandon and Jolly (1923), and by Bessis and Bricka (1952). Observations of this phenomenon are relatively frequent in blood smears, stained by usual methods, of embryos, or of animals with erythroblastosis (Albrecht, 1951; Brunner, 1968). The here observed agglomeration of some mitochondria in close proximity to the nuclear membrane, is not to be seen in the preceding phases. These aspects were also observed by Sorenson (1960), Grasso et al. (1962), Skutelsby and Danon (1967), Orlic et al. (1965). Simpson and Kling (1967) suggest that these mitochondria provide the energy necessary for extrusion; they also may be related to the constitution of a new membrane which is required at the site of the nuclear extrusion, according to Skutelsky and Danon (1967). The nuclear membrane pores disappear, and the nucleus becomes homogeneously electron dense. However, some authors, as Skutelsky and Danon 1967) described a heterogeneous nucleus, apparently liberated.

The nuclear extrusion process lasts for at least ten minutes, from inicial contractions to definite elimination, under examination conditions (Bessis and Bricka, 1952).

With exception of our findings and the ones of Zamboni (1965), the supposedly liberated nucleus seems to be surrounded by a thin cytoplasmic layer, containing one or more mitochondria (Grasso et al., 1962; Orlic et al., 1965; Simpson and Kling, 1967; Skutelsky and Danon, 1967, and Weiss, 1965). Details correlated with this phenomenon might be elucidated by serial sectioning of those erythroblasts or by an examination of a suspension of nuclei now liberated, and without cells. Depending on the level of sectioning, the nucleus may appear as already liberated; it must be considered that the erythroblasts present at this stage a well pronounced irregular configuration. It is quite possible that the few nuclei devoid of any cytoplasmic layer, observed by us and by Zamboni (1965) are the result of an artefact. Further investigations of numerous and totally isolated nuclei, may supply more detailed information.

The active movements still persist in the reticulocytes, as shown in Fig. 10. After this new evolutive stage the cell resumes its normal configuration which may be spherical or ovid, as shown in Fig. 20. At these evolutive stages the mitochondria increase in number and length, and assume considerably long, filamentous forms. At no time, erythroblasts show long structures similar to those observed during the reticulocytary phase.

By hemolysis method, technique A, and through comparative analysis, it can be verified that the number of mitochondria is higher in reticulocytes than in erythroblasts (Figs. 23-28). In this way however, mitochondria, disposed under or over the nucleus, are not detected, an error partially eliminated through the

replica method that shows that rarely erythroblast mitochondria are found over the nucleus. On the other hand, the majority of erythroblasts, used for such comparisons, presented a nucleus practically eliminated, a condition under which all organelles may be observed.

Tecnique B for hemolysis in suspension in distilled water, has also been used to compare the number of circular forms, resulting from the disintegration of mitochondria of those nucleated and anucleated cells. The results are the same (Figs. 29, 30).

The less developed reticulocytes (Figs. 28 and 30) present accentuated high amount of filamentous or circular forms, compared to the more evoluted and more frequent cells. This aggrees with the statistical values obtained with the ultrathin sectioning method. Reticulocytes, presenting mitochondria during the formation and growth process, are less frequent too, as will be shown below. Both observations suggest that the increase as well as the decrease of mitochondria is a relatively rapid process within the anucleated cells, thus reducing the probability of a frequent detection of these aspects.

Through ultrathin sections of erythroblasts and reticulocytes, values on mitochondrial areas per cell, were obtained and distributed, according to the histogram in Fig 31. This histogram shows a different distribution of classes among the two kinds of evolutive cells, which is in aggreement with the observations aforementioned, about those cells examined by the hemolysis method. The comparative histogram, concerning mitochondrial area, is more significant, although comparisons with respect to the number of these organelles per cell show also differences. A mitochondrion may be sectioned at variables planes, depending on its disposition within the cell, resulting either a diminute or a very large area.

Figure 31 shows high erythroblast frequencies, corresponding to small mitochondrial areas of about 0.30 μ^2; the frequencies decrease at about 0.90 μ^2, the highest value obtained. The inverse occurs in reticulocytes, up to 0.95 μ^2, although the larger areas of about 2.85 μ^2 correspond to low frequencies.

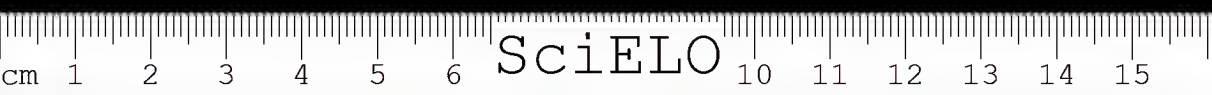
The increase of mitochondrial structures in reticulocytes evidently results from the formation of new organelles, or the growth of the pre-existent ones; it is quite possible that both phenomena are involved (Figs. 32-36). There are no data on the origin of mitochondria from canalicules as suggested for reticulocytes. Hoffman and Grigg (1958) reported the formation of mitochondria in onion root tip cells, rat thymus, and mouse lymph nodules, frequently ocurring during mitosis, what accounts for their similarity. The relationship between nuclei and mitochondria in those cells is the same; it has been verified that the external nuclear membrane is continuous to the mitochondrial membrane, suggesting that mitochondria are originating from it. The same relationship has been observed by Brandt and Pappas (1959) in the ameba *Pelomyxa carolinensis,* frequently in nuclear evagination. In other cases, the increase of mitochondrial number is due to the division of pre-existent organelles, as in rabbit oocytes (Blanchette. 1961). An important fact is Steinert's observation (1961) on the rhytydia phase of *Tripanosoma mega* from "in vitro" cultures, where the mitochondrion is derived from the Feulgen positive kinetoplast. After the completion of its development,

the mitochondrion is liberated, individualizing itself. This could be related to the findings of Chèvremont (1963) in fiblroblasts, whose mitochondria contain DNA, detected by Feulgen reaction. Further studies have shown that an incorporation of ^{3}H-thymidine occurs in those cells. These not yet generalized facts could explain the cytogenetical phenomena related to mitochondria.

The mechanism of hemoglobin biosynthesis in reticulocytes is not yet clear, due to the lability of the messenger RNA, only synthesized in the presence of DNA, according to the hypothesis on nucleocytoplasmic genetic relations of Jacob and Monod (1961). No DNA has been yet detected in reticulocytes. Some authors, however, as Nathans et al. (1962) suppose, that in such case, the messenger RNA would be well stable and synthesized at the nucleated phase. They noted that the incorporation of aminoacids is higher than the degradation of RNA, as determined by liberated ^{32}P measurements. Burny (1962) concluded that there exists RNA synthesis in reticulocytes, because ^{32}P was incorporated and distributed to the messenger and transfer RNA. On the other hand, Seno et al. (1963) verified that an incorporation of labeled uridine did not occur in these erythrocytes, concluding therefore, that any kind of RNA may be synthesized. Pinheiro et al. (1963) reported identical results, demonstrating that also labeled citydine and adenin are not incorporated at this erythrocytary phase.

The increase of mitochondrial structures at the reticulocytary phase coincides with higher capacity for hemoglobin synthesis at this evolutive phase, according to the microspectrophotometric determinations of Seno (1958). This aggress also with the equal or higher degree of ^{59}Fe incorporation by those erythrocytes in relation to erythroblasts, as observed by autoradiographic determinations in human bone marrow cultures (Lajtha and Suit, 1955; Suit et al., 1957). In rabbit bone marrow, the degree of ^{59}Fe incorporation is the same in both evolutive phases, but it increases highly in reticulocytes of the peripheral blood (Suit et al., 1957). Evidently these three facts are correlated with hemoglobin biosynthesis, considering that mitochondria take an important part in the biochemistry of these immature erythrocytes.

Reticulocytes of normal animals, intoxicated guinea-pigs, and embryos, show a membrane system, consisting of vesicles and dictyosomes (Fig. 22). This structural set composes the Golgi complex, as in other kinds of cells. The observation that the region which involves the contractile vacuoles of some protozoans, reduces the osmic acid, as occurs in the vertebrate Golgi complex, leads Nassonov (1924) to suggest the existence of a homology between these two structures. This hypothesis has been confirmed by Gatenby et al. (1955) through electron microscopic examination of protozoans and spongeans. This apparent homology involves the Golgi complex, as a control system for the osmotic equilibrium in cells, although other functions were atributed to this structure. It is possible that in reticulocytes this structure is involved in the loss of sodium, potassium, calcium, and phosphorus, whose concentrations are higher than the ones in mature red blood cells, according to Kay (1930), Rappaport et al. (1944), and Kruszynski (1955). Consequently, the elimination of water which is 5% higher in reticulocytes (Gaffney, 1957; Lowenstein, 1959) occurs too.

Reticulated, concentric or convoluted lamellar structures were described in basophilic myelocytes (Pease, 1956), epithelial cells from convoluted proximal mouse kidney tube (Clark, 1957), L-60 cells (Dales and Siminovitch, 1961),

and in epithelial cells from salamander branch (Schulz and de Paola, 1961). The function of these structures is unknown, just as the one rarely observed in reticulocytes from lead poisoned animals (Brunner and Vallejo-Freire, 1964). Similar structures were also found in smooth human megacolon fibers, and less frequently in the normal colon (Kiss, 1968). Jones (1966) reported an intramitochondrial formed lammellar structure, in early erythroblasts from fetal rats, arising from degenerated mitochondria, and followed by its extrusion from the cell, suggesting that this might be a normal secretory lipoprotein process.

All these structures, above described, disappear gradually as occurs with mitochondria. The external membrane is the first to disappear, followed by the internal one, and finally the double lamellas, clearly to be seen in Figs. 37 and 38. These less frequent reticulocytes from lead poisoned guinea-pigs does not present any mitochondria of increased volume nor disrupted lamellas, morphologically characterizing those immature erythrocytes (Fig. 10). The reticulocytes in Figs. 37 and 38 present a cytoplasm of low electron density due to its low hemoglobin content, and its mitochondria present themselves in degeneration, their function having ceased by now. According to Rouiller (1960) the degenerated mitochondrial forms vary in aspect, showing a disrupted or a single integral membrane. In the malignant melanoma of the ciliary body, similar aspects were found (Toledo, in press). Jones (1966) showed degenerated mitochondria of early erythroblasts, with the same forms as shown in reticulocytes.

The final stage of the evolutive erythrocytary process is characterized by distinctly shaped red blood cells. The obtained results confirm indirectly the existence of a structure at the molecular level. Its hemoglobin content (Bessis, 1961) attains about 33 per cent, e.g., in human blood cells.

Several authors suspect that there might exist a certain order in the interior of red blood cells. Dervichian et al. (1947), through X-ray diffraction of horse erythrocytes, came to the conclusion that there is a paracrystalline arrangement of hemoglobin molecules. Perutz (1948) suggests that the inner components of erythrocytes do not arrange themselves at random, in view of the molecular weight of hemoglobin and the red cell volume. Hitherto, it has also been shown that hemoglobin can crystallize in the red cells of some animals under certain conditions (Ponder, 1945). Pauling et al. (1949), in aggreement with the conclusions of other investigators, ascribe falciform anemias to a molecular intraerythrocytary disease. However, it seems that physicochemical surface phenomena, due to several factors in the blood plasma, are responsible for the shape of erythrocytes, as shown by Furchgott and Ponder (1940), Ponder (1948) and Bessis and Bricka (1950). Spherical or sea urchin forms were restored to their discoidal form by treatment of washed red cells, with normal plasma, albumin, glucose, and other substances; this was even observed in ghosts or stromas, void of hemoglobin. Besides these facts it is also known that the peripheral region of erythrocytes is more dense than the more internal one (Bessis and Bricka, 1950), where hemoglobin exists as a solution of high concentration. The periphery is constituted of lipoproteins and glucosides with only a small amount of hemoglobin (Ponder, 1948). Thus, the ultra-structure cannot be regarded merely as a sac, containing hemoglobin, or as a spongework in which hemoglobin is contained. The experimental results support the hypothesis that the structure seems to be something between these two alternatives (Bessis, 1961).

Guinea-pig erythrocytes, fixed by formalin in hypotonic saline, present an increased volume, maintaining however its discoidal-biconcave form (Figs. 39 and 40). These red cells show a peripheral electron dense region, limited by a very thin film, and a less dense internal region. The sections show an irregular meshwork, constituted by granules, larger and more agglomerated at the periphery than the ones from the central region; very thin filaments, long or short, link the granules to each other. When those erythrocytes are suspended in an aqueous osmic acid solution, after "fixation" with formalin, they resume their normal dimensions through retraction of their content, which becomes compact and highly electron dense, their membrane remaining stretched (Figs. 41 and 42). This aggrees with the observations of Dervichian et al. (1947), that the membrane might be independent of the inner erythrocytary structure. If erythrocytes were partially hemolysed through disrupture of the membrane, this retraction, provoked by osmic acid, did not occur, what might be explained by the partial loss of their content.

These observations aggree also with the aforemenitioned experimental results, suggesting that, at least in part, besides external factors, also an internal molecular arrangement would be responsible for the shape of red blood cells.

CONCLUSIONS

1. Megaloblasts, erythroblasts, and reticulocytes hemolized in partially dried blood smears, and integrally examined, present large filaments and rods identified as mitochondria, and thin filaments, corresponding to the endoplasmic reticulum and polyribosomic granules, diffusively distributed.

2. When hemolysis is performed in suspension in distilled water, without partial drying, the filamentous mitochondria disintegrate, giving rise to circular forms. Intermediary structures between the filamentous and circular forms are observed when hemolysis is interrupted.

3. Erythroblasts and reticulocytes, supravitally stained with Janus green B show an agglomeration of endoplasmic reticulum, and a dye-polyribosomic precipitate, surrounding the mitochondria. As a whole, this constitutes the so-called "Substantia granulo-filamentosa". This concept is restricted to the filamentous or rodlike mitochondria of those unstained cells, only hemolysed in partially dried smears.

4. The nucleus of erythroblasts shows equal electron dense regions as cytoplasm, continuous with the latter through the pores of the nuclear membrane. This fact and the specific absorption determinations at wave length of 4047 Å (Carvalho, 1953; Davies, 1961), or 4060 Å (Seno, 1958), suggest the presence of hemoglobin or of the heme-group within the nucleus.

5. The nucleus of erythroblasts is eliminated by extrusion, a process not yet completely elucidated. Aspects which may suggest a karyolysis or karyorrexis process, were rarely observed.

6. The number of mitochondria in the less evoluted reticulocytary stage is higher than in the nucleated phase. This coincides with the higher isotopic iron

uptake (Laitha and Suit, 1955; Suit et al., 1957), and with the higher activity of hemoglobin biosynthesis in reticulocytes in relation to erythroblasts (Seno, 1958).

7. The increase in mitochondrial number in early reticulocytes is due to the formation of new organelles, arising from canalicules. This increase might also result through growth of the already existent mitochondria.

8. Erythroblasts and reticulocytes show an endoplasmic reticulum close to the mitochondria, and continuous to the plasmic membrane, constituting pores at the cell surface. The function of this canalicular system is supposed to conduct material between the inner structures, mainly the mitochondria, and blood plasma.

9. The Golgi complex observed in reticulocytes is identical with that of other kinds of cells. It is quite possible that its function is related to the salt-water equilibrium between cells and blood plasma.

10. All these structures disappear gradually as the concentration of hemoglobin increases. Mitochondria disappear through sucessive loss of the external membrane, followed by the internal one, and finally by the double lamellas.

11. The mature erythrocyte has probably an internal structure at the molecular level, independent of the stroma or the limiting membrane. This molecular arrangement would be, in part, responsible for the discoidal and biconcave form of the erythrocyte.

RESUMO: A série eritrocitária do sangue periférico de embriões de coelho e hamster foi submetida a estudos ao nível ultraestrutural pelos métodos de hemólise, segundo três técnicas, e através de cortes ultrafinos. Pelo método de hemólise em esfregaço foi constatada a presença de mitocôndrios filamentosos ou em bastonete, que se desintegram em formas membranosas circulares quando a hemólise se processa em suspensão em água destilada.

Após a extrusão nuclear, geralmente ocorrente no eritroblasto ortocromático, acompanhada de movimentos citoplasmáticos ativos de contrações e expansões, foi constatado um aumento da quantidade de mitocôndrios, fato coincidente com a maior intensidade de síntese de hemoglobina, segundo verificações de outros autores.

Além dos organelos participantes na síntese hemoglobínica, como mitocôndrios e poliribosomos, foi observada ainda a presença do complexo de Golgi, provàvelmente com função no equilíbrio da água e sais no reticulócito, no decorrer da maturação. Foi constatada a presença de vesículas e de retículo endoplasmático liso.

A maturação final do eritrócito caracteriza-se pelo aumento crescente na concentração em hemoglobina com o desaparecimento gradual de tôdas as estruturas citoplasmáticas e a aquisição da forma discoidal bicôncava característica, constituida apenas por uma estrutura ordenada, paracristalina, ao nível molecular.

UNITERMOS: Maturação eritrocitária.

ACKNOWLEDGEMENTS.

The author is indebted to Prof. Dr. Paulo Sawaya, Director of the Departamento de Fisiologia Geral e Animal at the Universidade de São Paulo, for his helpful orientation during the course of this work.

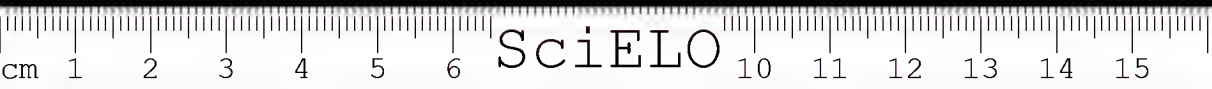
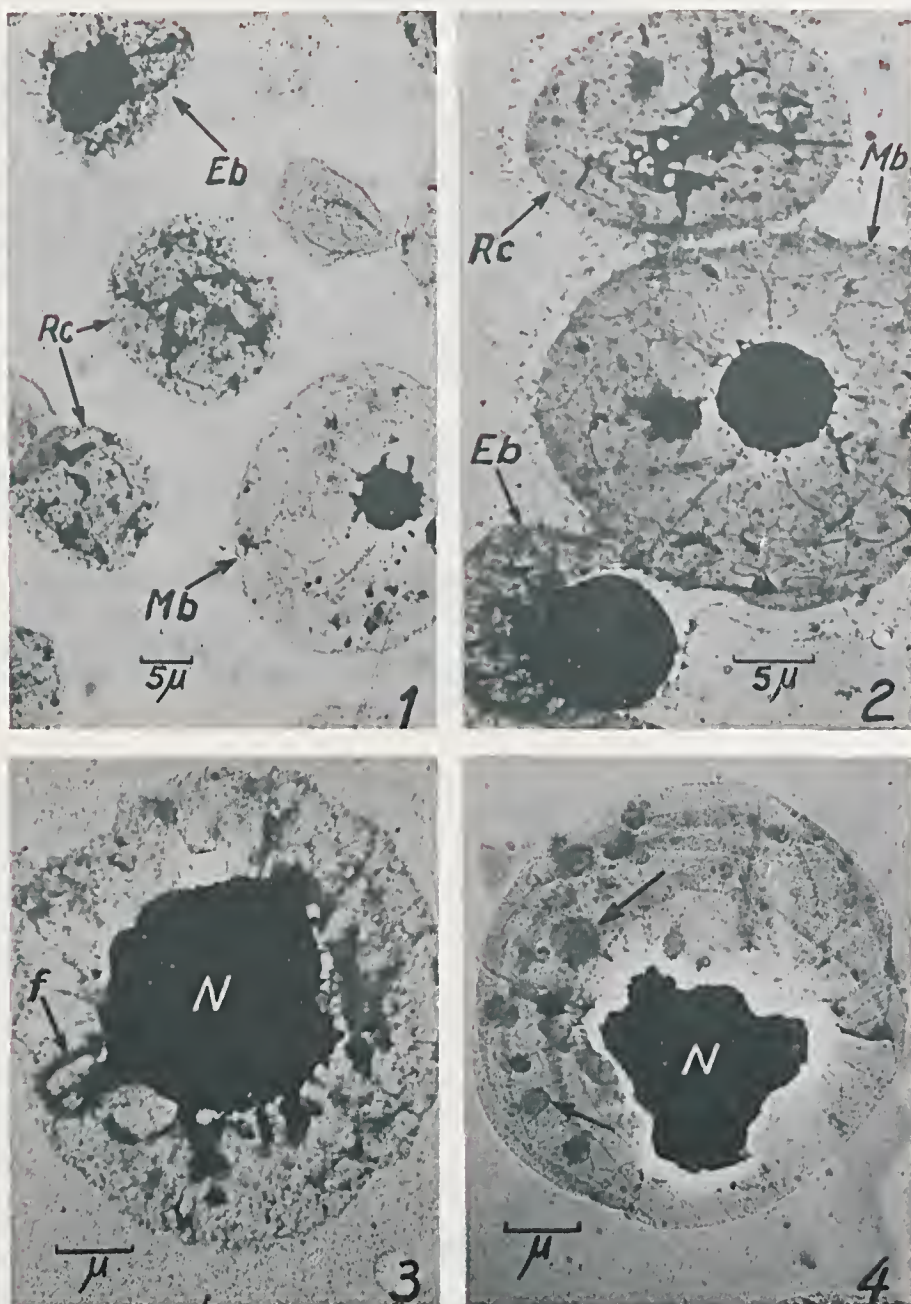
To the sucessive Directors of the Instituto Butantan, Dr. Aristides Vallejo-Freire, Prof. Dr. Lucio Penna de Carvalho Lima, and Dr. Jandyra Planet do Amaral for material support, and for facilities and conditions provided during the realization of this work.

To Prof. Ary J. Dias Mendes and Prof. Clóvis de Araújo Peres, from the Departamento de Estatística of the Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras at the Universidade de São Paulo, for their help in statistical analysis.

To Mrs. Sibylle Heller for translation and editorial aid.

To Mr. José Antônio de Toledo Bilotta for his extensive tecnical work; Miss Alice Henrique Pedreira, Mr. Eduardo Navas Neto, and Mr. Roberto Navas for typewriting.

To Mr. Taufic Aucd, and Mr. Antônio Seixas Neto for the execution of the electromicrographs.

Dedication: To my parents, Olga Brunner and Adolpho Brunner. To my wife, Margarida and my daugthers Olga and Luiza.

Hemolysed embryo blood.

Figs. 1 and 2. — *Mb* — megaloblasts; *Eb* — erythroblasts; *Rc* — reticulocytes. Technique A.

Fig. 3 — Erythroblast. *N* — nucleus; *f* — large filaments. Technique A.

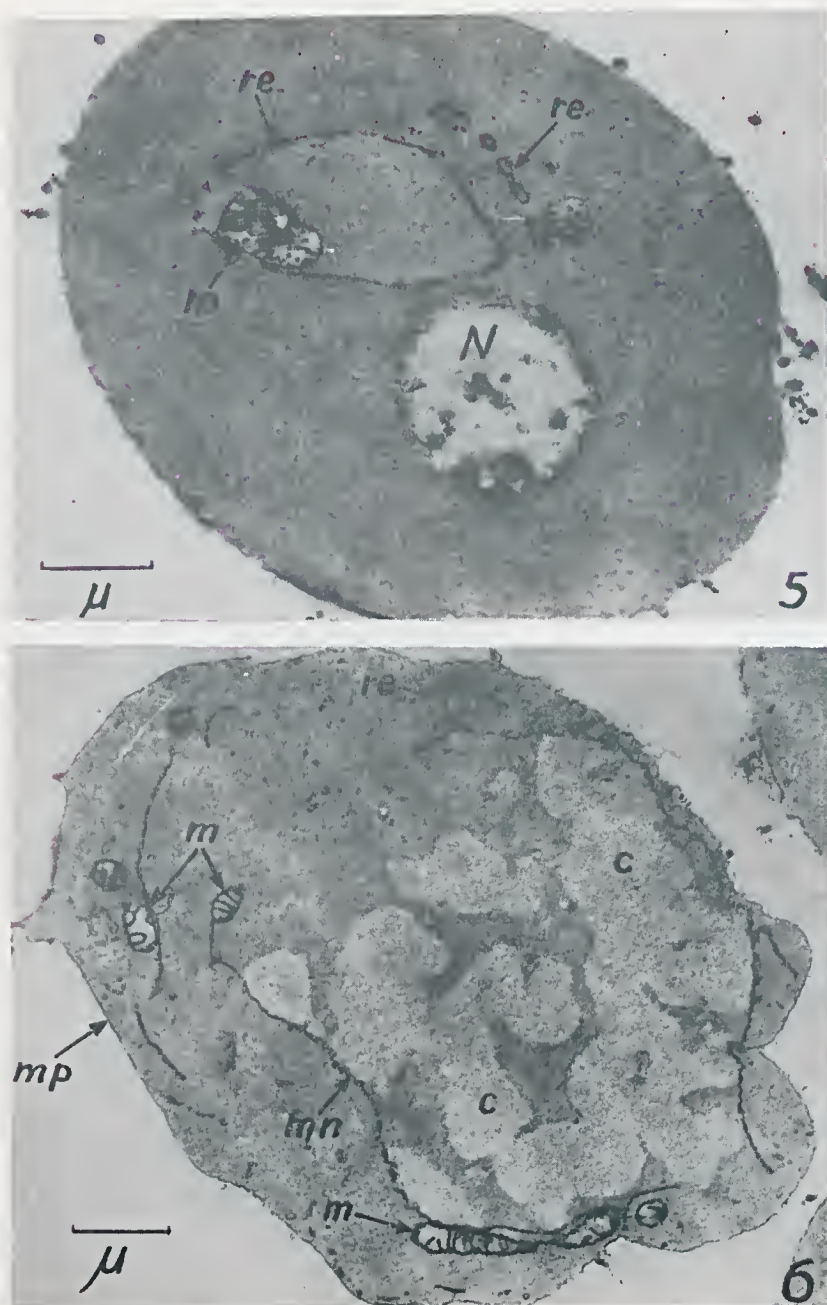
Fig. 4 — Erythroblast. *N* — nucleus; *arrows* — circular forms. Technique B.

Embryo blood. Thin sections stained with lead acetate. Epon 812.

Fig. 5 — Megaloblast. *N* — nucleus; *m* — mitochondria; *re* — endoplasmic reticulum;

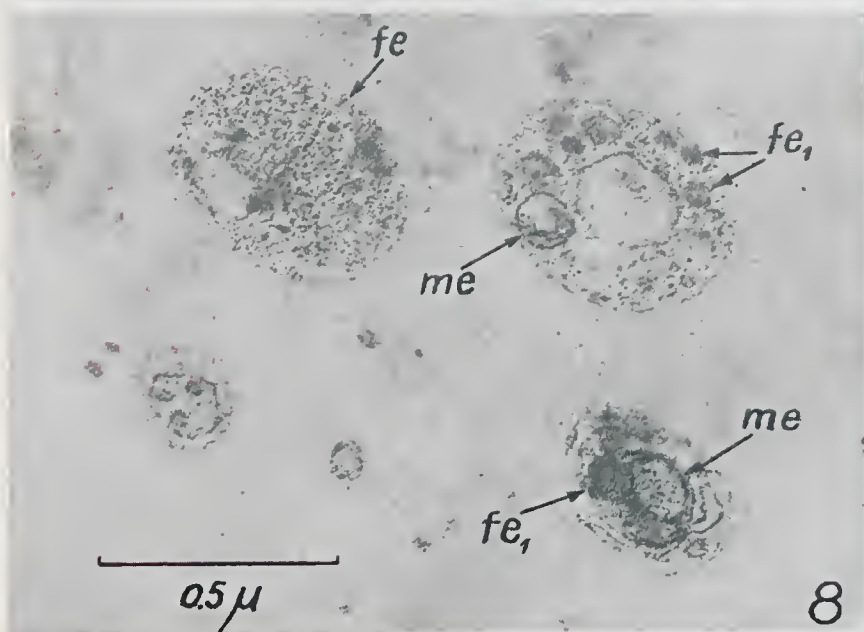
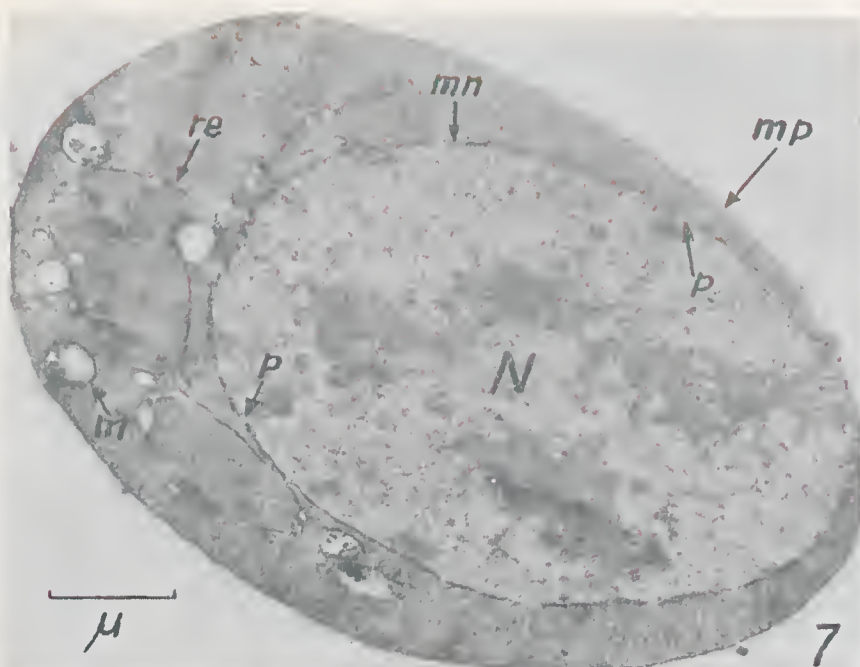
Fig. 6 — Mitotic erythroblasts, *c* — chromosomes; *mn* — nuclear membrane; *m* — mitochondria; *re* — endoplasmic reticulum; *mp* — plasmic membrane.

Embryo blood. Thin sections stained with lead acetate.

Fig. 7 — Polychromatophilic erythroblast. *N* — nucleus; *p* — pores; *mn* — nuclear membrane; *m* — mitochondria; *re* — endoplasmic reticulum; *mp* — plasmic membrane. Epon 812.

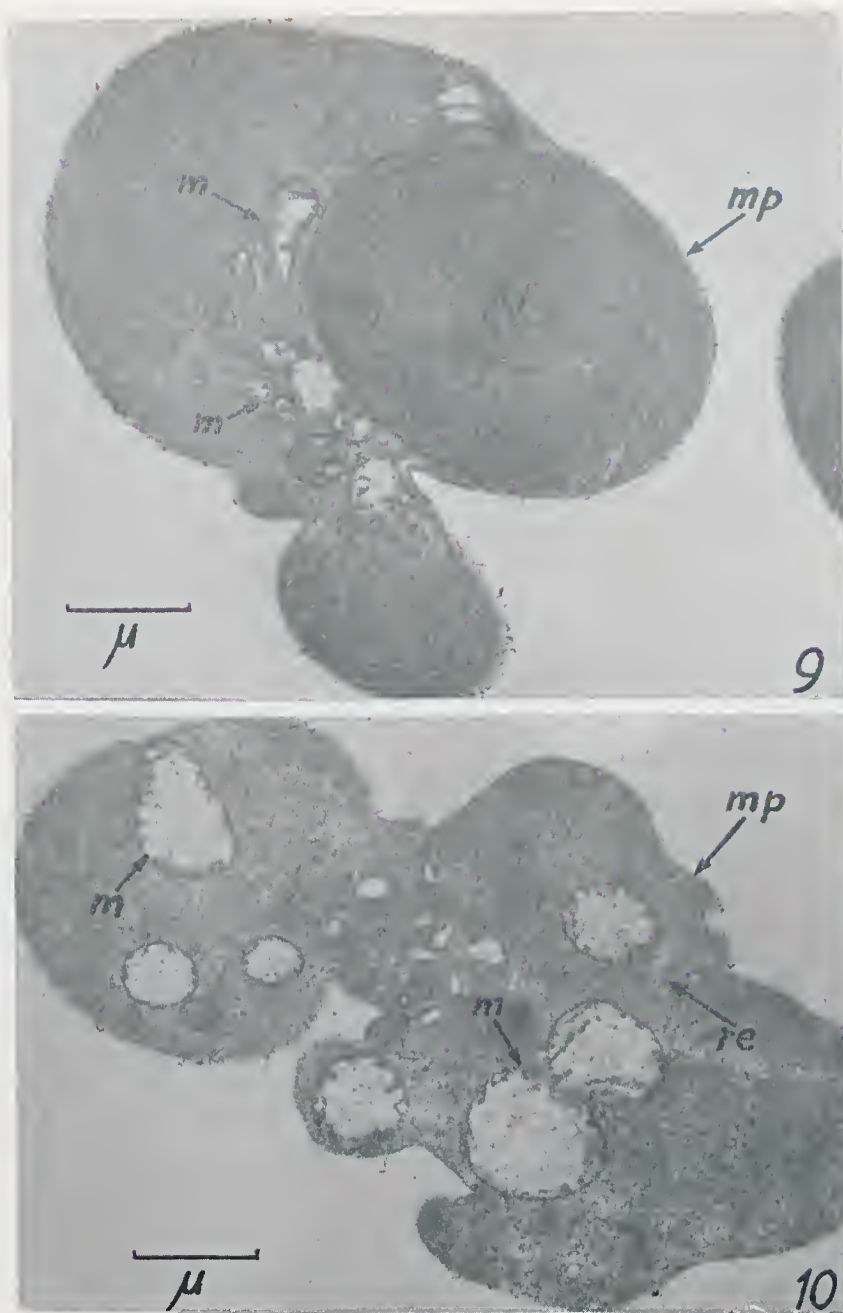
Fig. 8 — Erythroblast. *fe* — ferritin grains; *me* — mitochondrial membrane; fe_1 — electron dense agglomerated grains. Crystic-araldite.

Blood of lead poisoned guinea-pigs. Methyl-butyl methacrylate.

Fig. 9 — Acidophilic erythroblast. *N* — nucleus; *m* — mitochondria; *mp* — plasmic membrane.

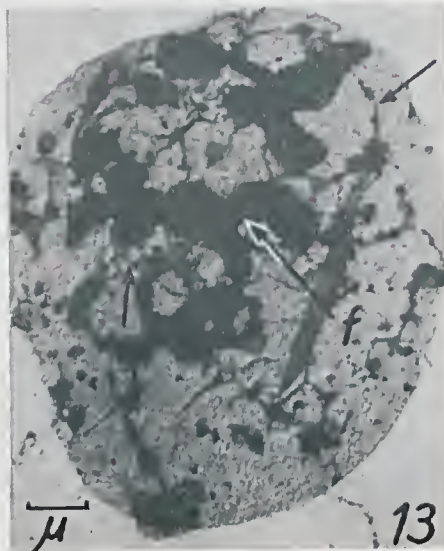
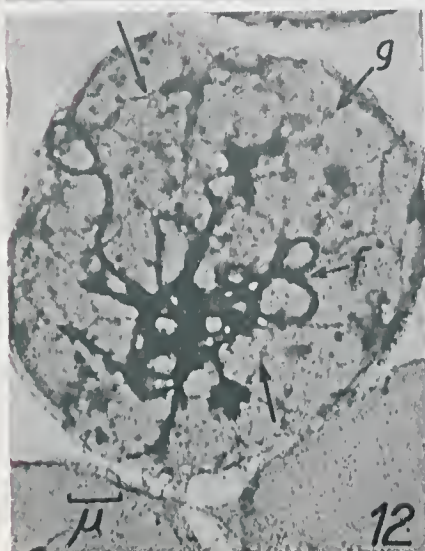
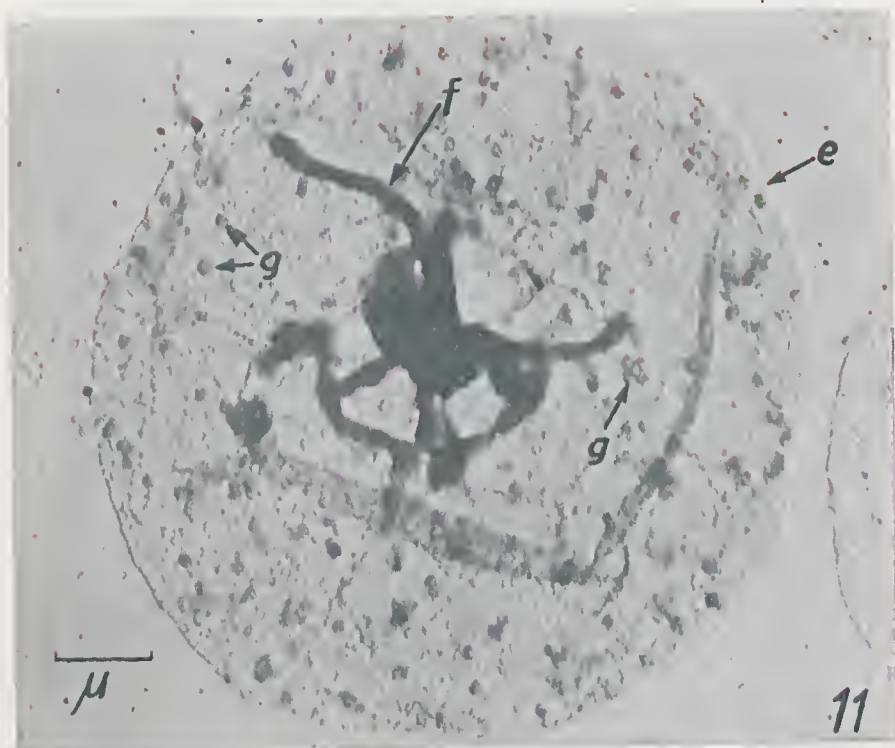
Fig. 10 — Early reticulocyte. *m* — mitochondria; *re* — endoplasmic reticulum; *mp* — plasmic membrane.

Hemolysed reticulocytes of guinea-pig blood (Technique A).

Fig. 11 — Bleeding anemia. *f* — large filaments; *g* — polyribosomes; *e* — stroma.

Fig. 12 — Bleeding anemia. *f* — large filaments; *g* — polyribosomes; *arrows* — thin filaments.

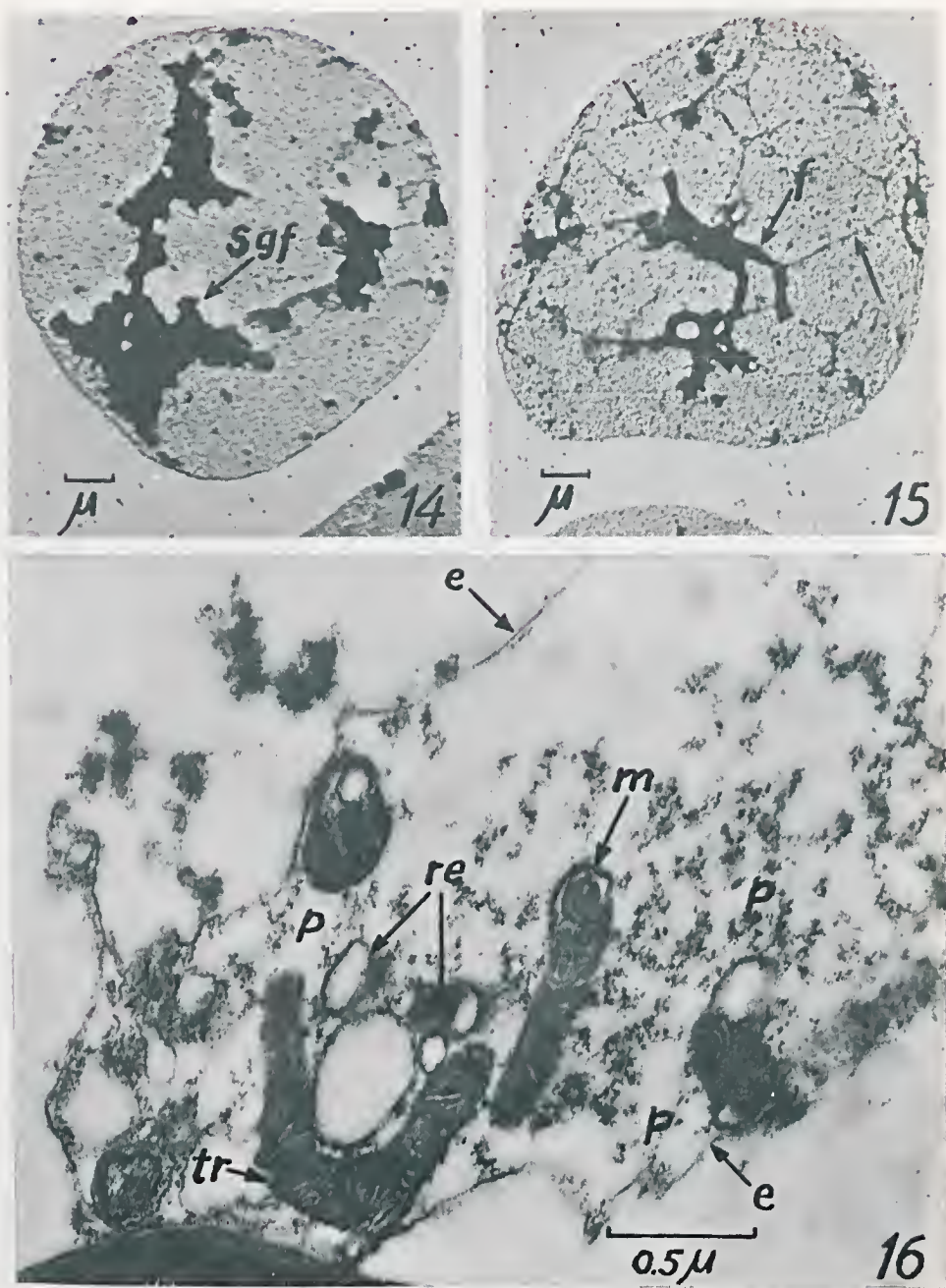
Fig. 13 — Lead poisoning anemia. *f* — large filaments; *g* — polyribosomes; *arrows* — thin filaments.

Bleeding anemia. Reticulocytes supravitally stained with Janus green B.

Fig. 14 — Dye at 1×10^{-4}. *Sgf* — "Substantia granulo-filamentosa". Technique A.

Fig. 15 — Dye at 5×10^{-6}. *f* — large filaments; *arrows* — thin filaments. Technique A.

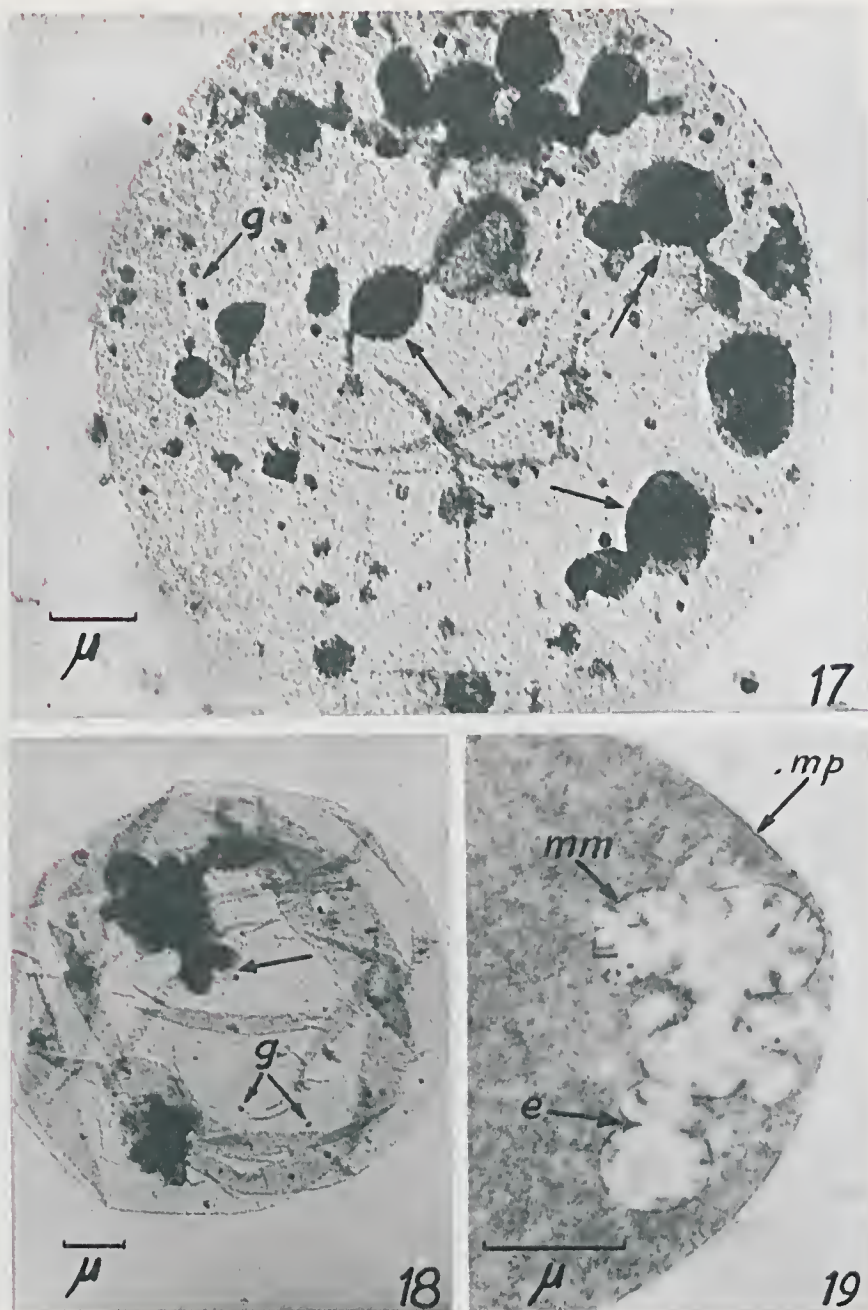
Fig. 16 — Thin section. Dye at 1x10 . *m* — mitochondria; *tr* — double lamellas; *re* — endoplasmic reticulum; *p* — polyribosomes; *e* — stroma. Methyl-butyl methacrylates.

Bleeding anemia. Reticulocytes.

Fig. 17 — Hemolysis (technique B). *Arrows* — circular forms; *g* — polyribosomes.

Fig 18 — Hemolysis (technique C). *Arrows* — not individualized circular forms; *g* — polyribosomes.

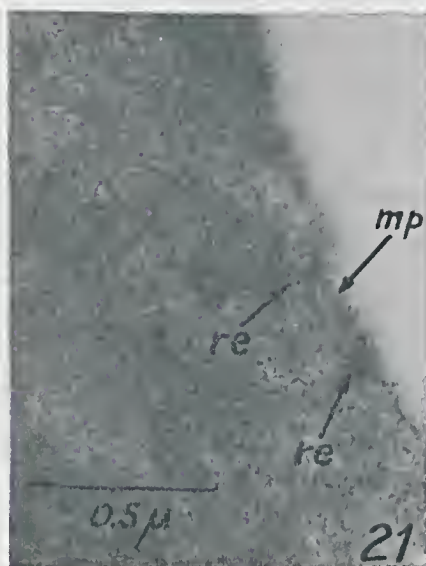
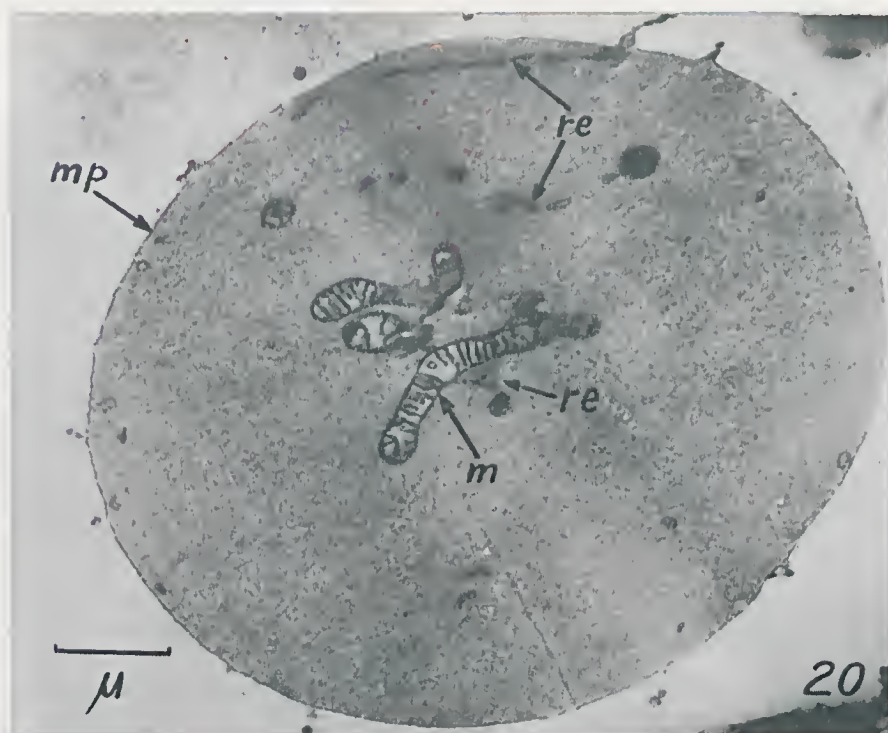
Fig. 19 — Thin section. *e* — constrictions; *mm* — mitochondrial membranes; *mp* — plasmic membrane. Methyl-butyl methacrylates.

Thin sections of reticulocytes. *mp* — plasmic membrane; *re* — endoplasmic reticulum; *m* — mitochondria.

Fig. 20 — Embryo blood. Epon 812; lead acetate.

Fig. 21 — Lead poisoned guinea-pig blood. Methyl-butyl methacrylates.

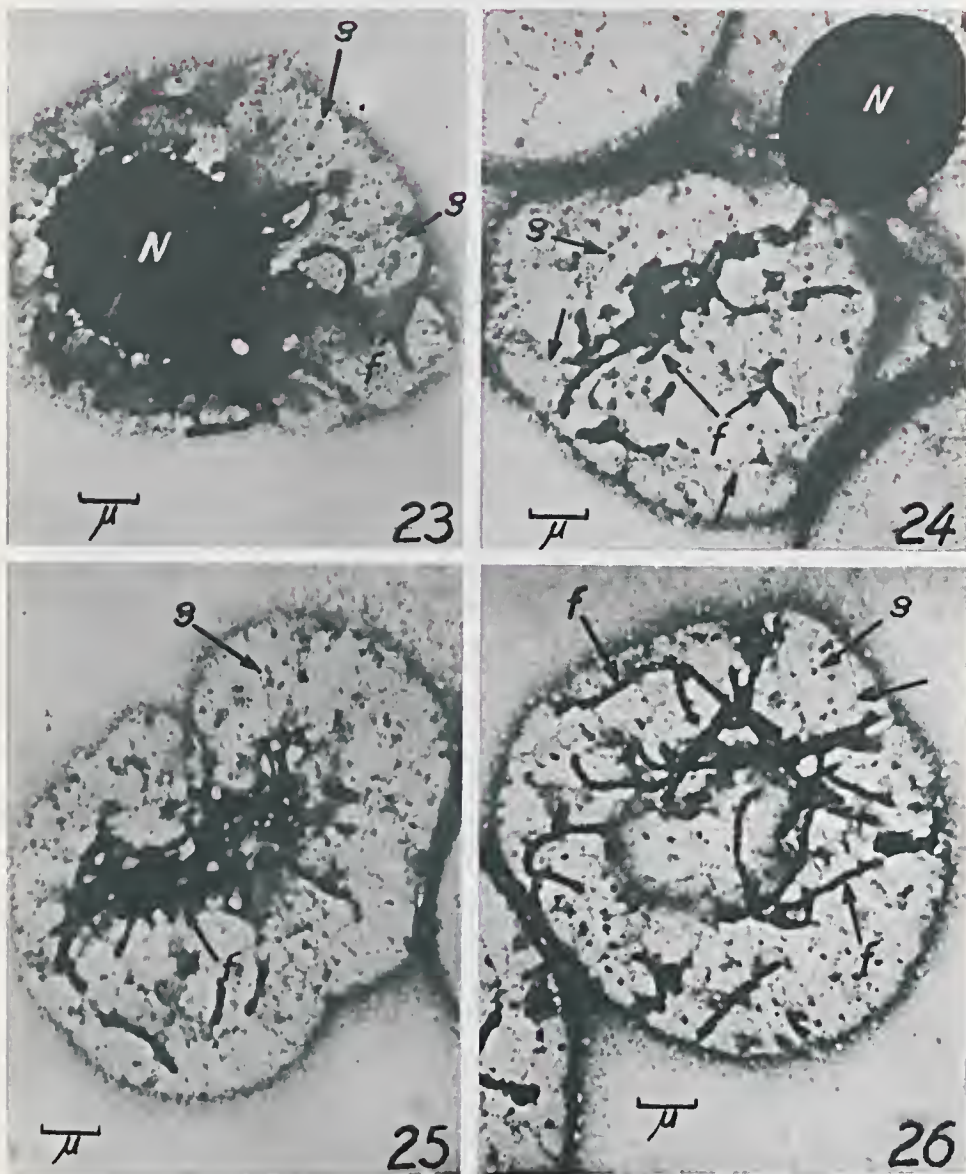
Fig. 22 — Embryo blood. *d* — dictyosome; *v* — vesicles. Epon 812; lead acetate.

Hemolysed embryo blood smears (technique A). *N* — nucleus; *f* — large filaments (mitochondria); *arrows* — thin filaments (endoplasmic reticulum); *g* — polyribosomic granules.

Fig. 23 — Erythroblast. Mitochondrial area (f) — 8.5 μ^2.

Fig. 24 — Erythroblast. *f* — 3.6 μ^2.

Fig. 25 — Reticulocyte. *f* — 8.6 μ^2.

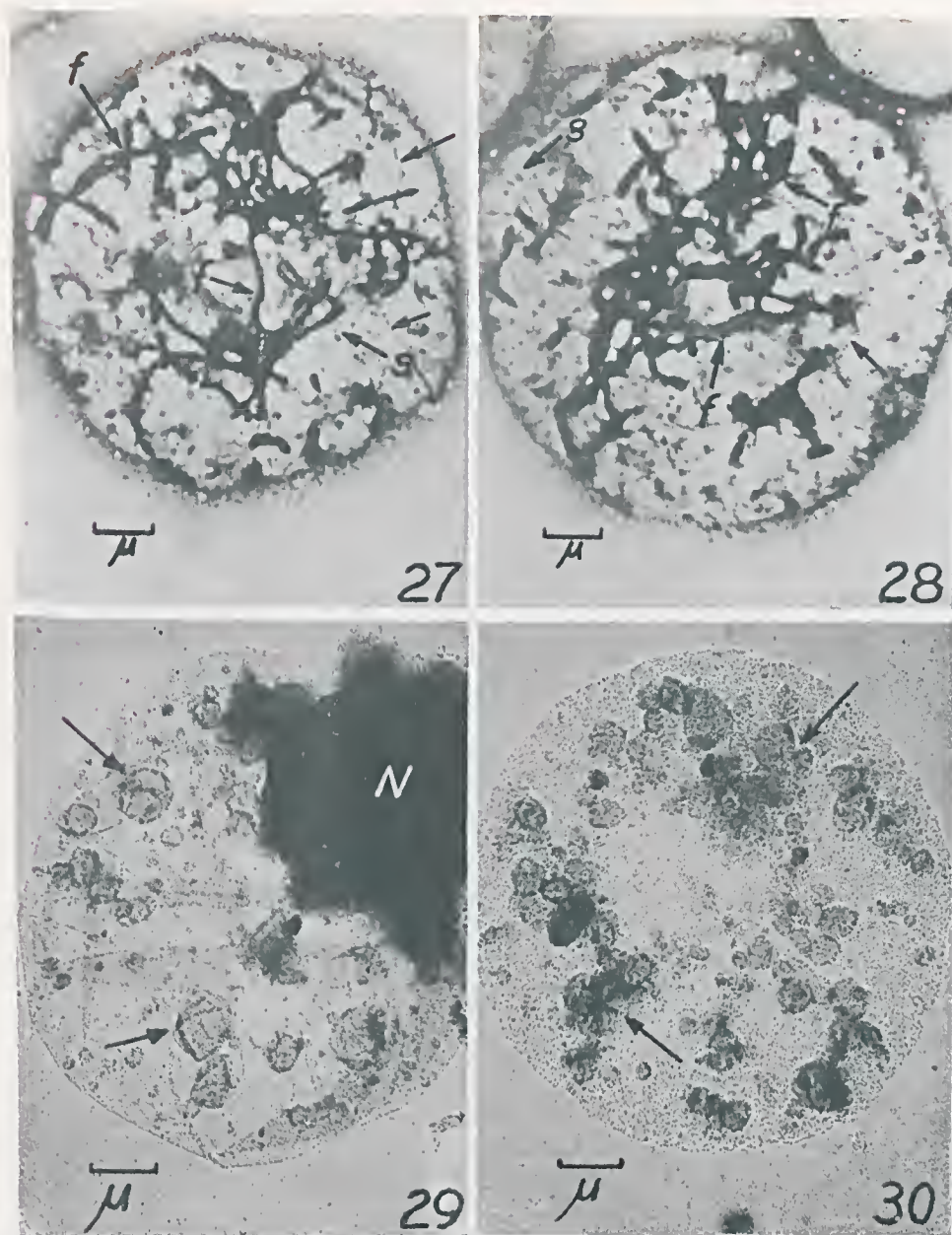
Fig. 26 — Reticulocyte. *f* — 12.7 μ^2.

Hemolysed embryo blood smears (technique A). *Arrows* — thin filaments (endoplasmic reticulum); *g* — polyribosomic granules; *f* — large filaments (mitochondria).

Fig. 27 — Reticulocyte. *f* — 16.7 μ^2.
Fig. 28 — Reticulocyte. *f* — 17.2 μ^2.

Hemolysed embryo blood (technique B). *Arrows* — circular forms (disintegrated mitochondria).

Fig. 29 — Erythroblasts. *N* — nucleus.
Fig. 30 — Reticulocyte.

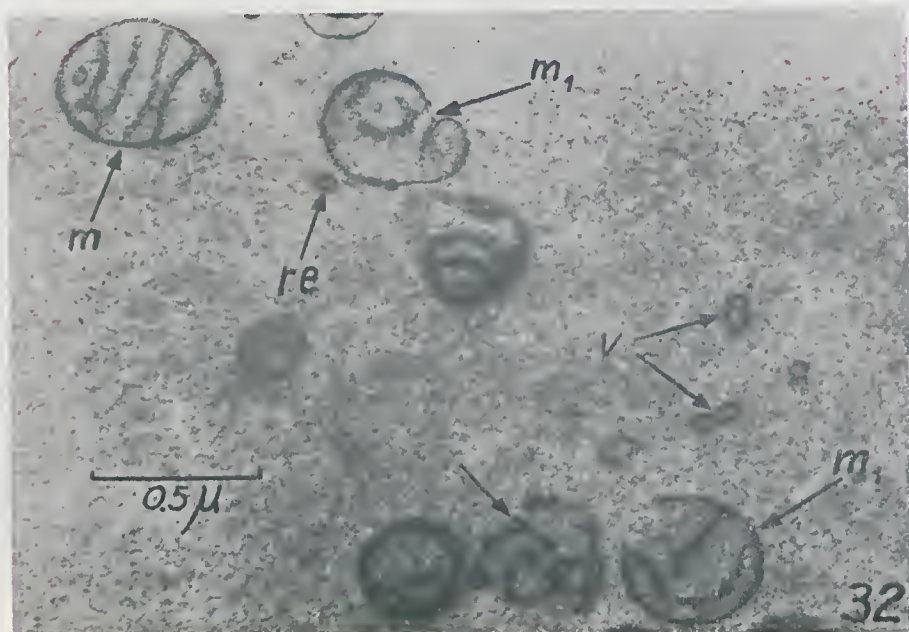
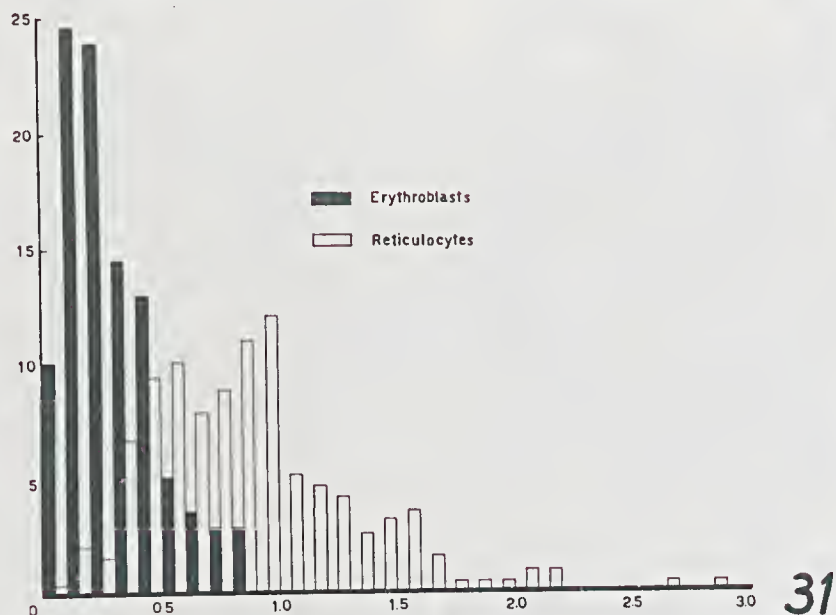



Fig 31 — Frequency distribution histogram presenting mitochondrial areas (μ^2)/ cell — abscissa — of sectioned erythroblasts and reticulocytes with intervals of 0,1 μ^2. Ordinate: % of cells.

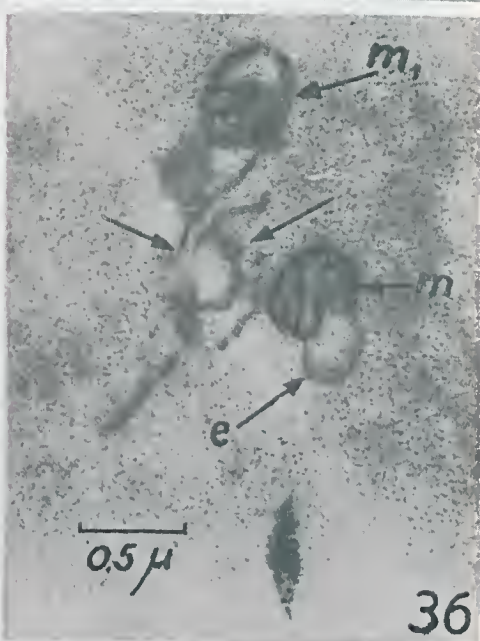
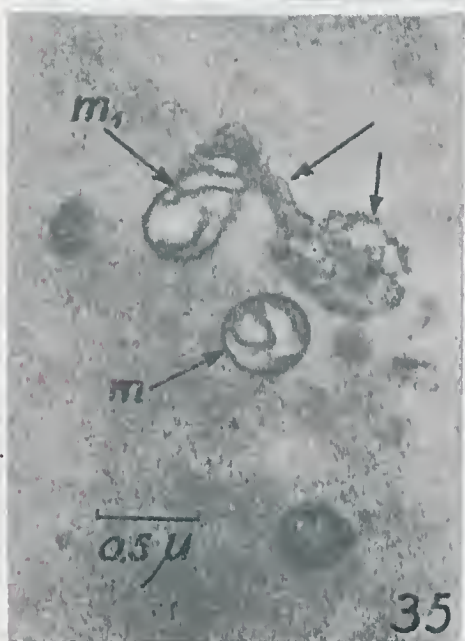
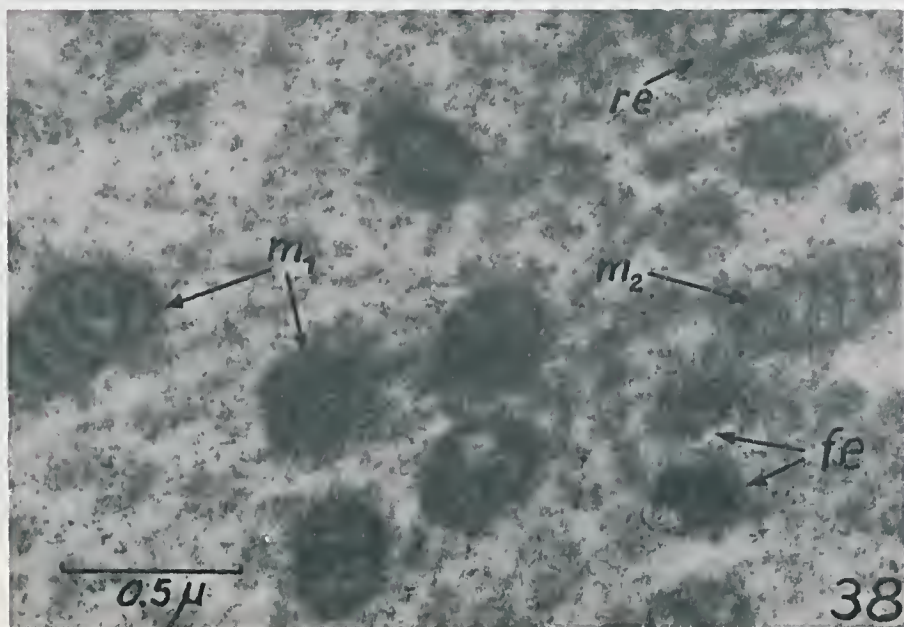
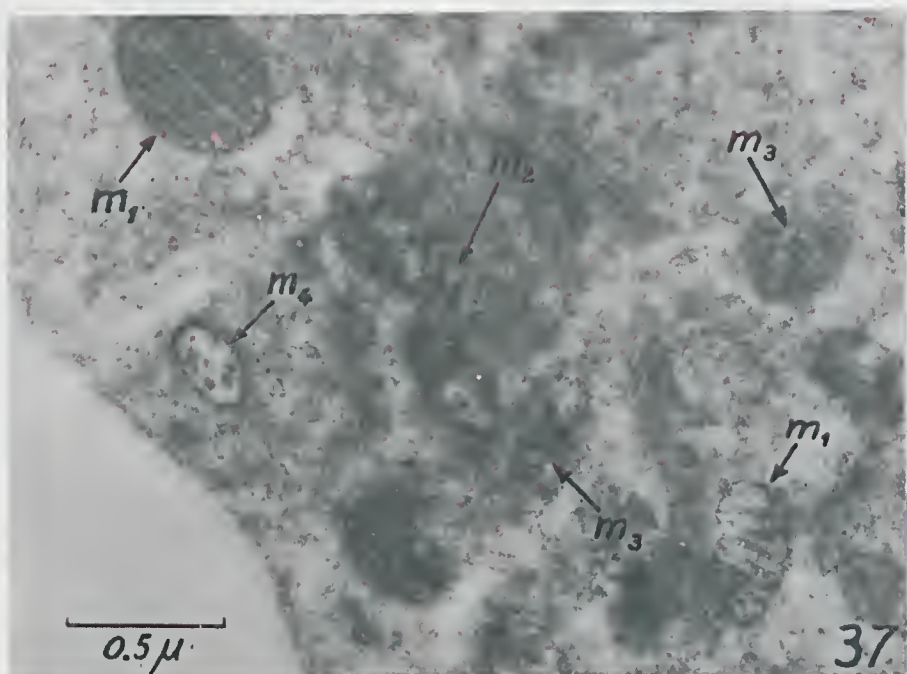
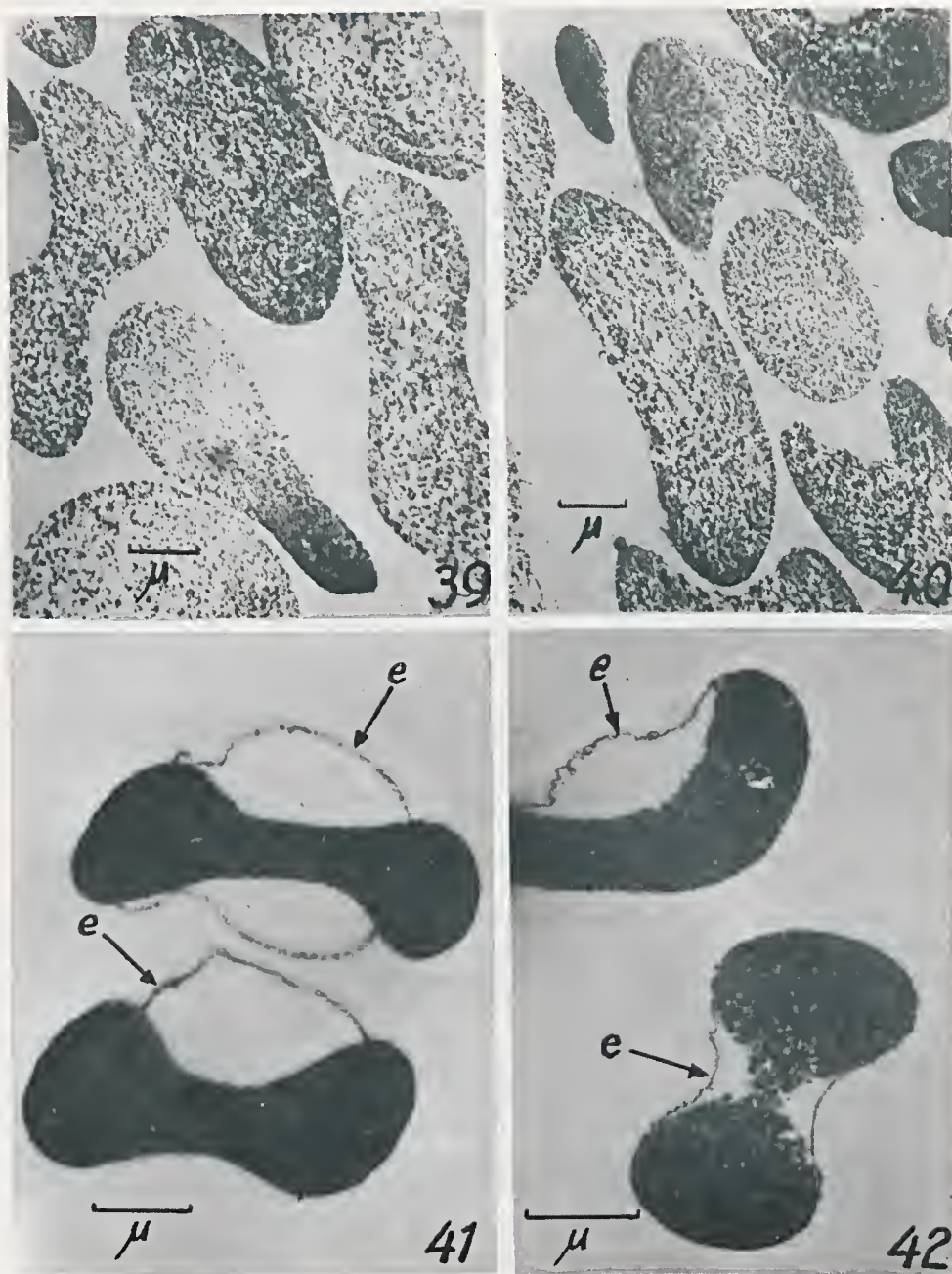
Fig. 32 — Mitochondriogenesis in a reticulocyte. m_1 — mitochondria formation; m — mitochondrion; *re* — endoplasmic reticulum; *V* — vesicles; *arrows* — canalicules. Epon 812; lead acetate.

Mitochondriogenesis in reticulocytes. Epon 812; lead acetate.

Fig. 33 — 1 — double lamellas; *V* — vesicles.

Fig. 34 — m_1 and m_2 — mitochondria formation; *m* — mitochondrion; *re* — endoplasmic reticulum.

Fig. 35 — m_1 — mitochondrion formation; *arrows* — canalicules; *m* — mitochondrion.

Fig. 36 — m_1 — mitochondrion formation; *arrows* — canalicules; *m* — mitochondrion with a membranous expansion (e).

Figs. 37 and 38 — Reticulocytes of lead poisoned guinea-pigs, presenting degenerative mitochondrial forms (m_1, m_2, m_3); m_4 — mitochondrion with digitiform membrane system; *fe* — ferritin granules; *re* — endoplasmic reticulum. Methyl-butyl methacrylates.

Mature erythrocytes of normal guinea-pigs, fixed with formalin in hypotonic NaCl solution. Embedding in methyl-butyl methacrylates.

Figs. 39 and 40 — Erythrocytes stained by phosphotungstic acid.

Fig. 41 and 42 — Erythrocytes treated by aqueous osmic acid solution after "fixation" with formalin in a hypotonic medium; *e* — envelope or membrane.

REFERENCES.

ALBRECHT, M. — Studien zur Frage der Erythroblastenentkernung an Kulturen von Meerschweinchenknochenmark. *Acta Haematologica*, **6**:83-91, 1951.

ASTALDI, G., GALLO, V., e INVERNIZZI, P. — Valutazione Quantitativa degli Asincronismi di Maturazione Nucleo-Citoplasmatica delle Cellule·Midollari. I. Recherche sugli Erithoblasti dell'Anemia Perniciosa Prima e Durante il Tratamento. *Archivio Scienze Mediche*, **90**:502-505, 1950.

BERMAN, L. — The Clinical Significance of Cellular Gigantism in HumanEròthropoiesis. *J. Lab. Clin. Med.*, **32**:793-806, 1947.

BERNHARD, W., BRAUNSTEINER, H. et MANGINI, H. — Étude des Réticulocytes au Microscope Électronique. *C. R. Soc. Biol.*, **143**:1513, 1949.

BESSIS, M. — Traité de Cytologie Sanguine. Edit. par Masson et Cie. — Paris, pg. 219, 1954.

BESSIS, M. — The Blood Cells and Their Formation in "The Cell", J. Brachet and A. E. Mirsky, eds., **5**:168 and 169, 1961, Acad. Press, New York.

BESSIS, M. et BRETON-GORIUS, J. — Le Cycle du Fer dans I'Organisme Révéle par le Microscope Électronique. *Pathologie et Biologie*, **19**:2173-2194, 1957.

BESSIS, M. et BRICKA, M. — Aspect Dynamique des Cellules du Sang. Son Étude par la Microcinémetographie en Contraste de Phase. *Rev. Hémat.*, **7**:407-435, 1952.

BLANCHETTE, E. J. — A Etudy of the Fine Structure of the Rabbit Primary Oocyte. *J. Ultrastructure Res.*, **5**:349-363, 1961.

BRANDT, P. W. and PAPPAS, G. D. — II. The Nuclear-Mitochondria Relationship in*Pelomyxa carolinensis* Wilson (Chaoschaos L.). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **6**:91-95, 1959.

BRAUNSTEINER, H., FELLINGER, K. UND PAKESCH, F. — Über die Strucktur der Reticulocyten. *Acta Haemat.*, **16**:322-328, 1956.

BRUNNER JR. A. — A Estrutura Intrareticulocitária. *Mem. Inst. Butantan*, **30**:15-26, 1962.

BRUNNER JR., — Observações não publicadas. 1968.

BRUNNER JR., A. and VALLEJO-FREIRE A. — Electron Microscopic Observations on Granules and Filaments (reticulosomes) of Reticulocytes. *Exp. Cell Res.*, **10**:55-62, 1956.

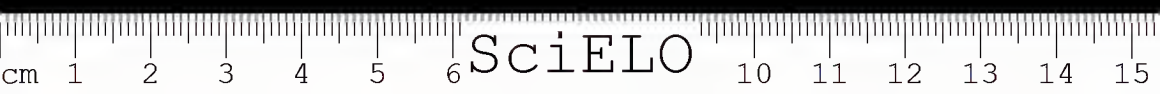
BRUNNER JR., A. VALLEJO-FREIRE, A. and SOUZA SANTOS, P. — Electron Microscopy of Thin Sections of Reticulocytes. *Experientia*, **12**:255, 1956.

BRUNNER JR., A. e VALLEJO-FREIRE, A. — Estrutura Lamelares em Reticulócitos. *Mem. Inst. Butantan*, **31**:9-14, 1964.

BURNY, A. — Incorporation de Phosphore Radio-actif dans les Acides Ribonucléiques des Réticulocytes de Lapin "In Vitro". *Arch. Inter. Physiol. Biochim*, **70**:742-743, 1962.

BURT, N.S., MURRAY, R.G.E. AND ROSSITER, R.J.. — Nucleic Acids of Rabbit Reticulocytes. *Blood*, **6**: 906-915, 1951.

CARVALHO, S. DE — Recherches Cytochimiques et Experimentales sur les Relations de I'Hémoglobinogénèse avec la Synthèse des Protéines dans l'Erythroblaste. *Acta Haematologica*, **9**: 220-227, 1953.

CESARIS-DEMEL, A. — Studien über die Roten Blutkörperchen mit den Methoden der Färbung in Frischen Zustande. *Folia Haematologica*, **4** *(Suppl.* 1): 1-32, 1907.

CHÈVREMONT, M. — "Cytoplasmic DNA", in "Cell Growth and Cell Division", R.J.C. Harris, Ed., p. 323, Acad. Press, New York, 1963.

CLARK, S.L. — Cellular Differentiation in the Kidneys of Newborn Mice Studied with the Electron Microscope. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **3**: 349-362, 1957.

COMANDON, J. ET JOLLY, J. — Film. Cited by Jolly, J. in "Traité Technique d' Hématologie", **2** : Maloine, édit. Paris, 1923.

DALES, S. AND SIMINOVITCH, L. — The Development of Vaccina Virus in Eearle's L. Strain Cells as Examined by Electron Microscopy. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* **10**: 475-504, 1961.

DAVIES, H. G. — Structure in Nucleated Erythrocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 671-687, 1961.

DERVICHIAN, D. G., FOURNET, G. ET GUINIER, A. — Mise en Évidence d'une Structure Submicroscopique dans les globules Rouges par la Difusion des Rayons X au Petit Angles *C. R. Acad. Sciences*, **224**(26): 1848-1850, 1947.

DUSTIN JR., P. — Ribonucleic Acid and Vital Staining of Cytoplasmic Vacuoles in Animal Cells. Symposium on Nucleic Acids. In Soc. *Exp. Biol.*, Cambridge Univ. Press, **1** : 114-126, 1947.

FAWCETT, D. W. and WITEBSKY, F. — Observations on the Ultrastucture of Nucleated Erythrocytes and Thrombocytes, with Particular Reference to the Structural Basis of their Discoidal Shape. *Zeitschr. Zelforsch.*, **62**: 782-806, 1964.

GAFFNEY, F. M. — Experimental Haemolytic Anemia with Particular Reference to the Corpuscular Haemoglobin concentration of Erythrocytes. *Brit. J. Haematol.*, **3**: 311-319, 1957.

GATENBY, J. B., DALTON, A. J. and FELIX, M.D. — The Contractil Vacuole of of Parazoa and Protozoa, and the Golgi Apparatus. *Nature*, **176**: 301-302, 1955.

GRASSO, A., SWIFT, H. and ACKERMAN, G. A. — Observations on the Development of Erythrocytes in Mammalian Fetal Liver. *J. Cell Biol.*, **14**: 235-254, 1962.

HOFFMAN, H. and GRIGG, G. W. — An Electron Microscopic Study of Mitochondria Formation. *Exp. Cell Res.*, **15**: 118-131, 1958.

JACOB, F. and MONOD, J. — Genetic Regulatory Mechanism in the Synthesis of Proteins. *J. Mol. Biol.*, **3**: 318-356, 1961.

JOLLY, J. — Traité Technique d'Hématologie, vol. II, Maloine, édit., Paris, 1923.

JONES, O. P. — Formation of Intramitochondrial Lamellated Bodies and their Extrusion from Early Erythroblasts. Sixth Intern. Congress for Electon Microscopy, Kyoto, 1966.

KAY, H. D. — Blood Phosphorus in Health and Disease. V. Note on the Chemical Composition of the Reticulocyte. Brit. *J. Exp. Pathl.*, **11**: 148-152, 1930.

KISS, R. D. — Personel communication, 1968.

KOSENOW, H. — Über den Strukturwandel der Basophilen Substanz Junger Erythorocyten in Fluoreszensmikroskop. *Acta Haemat.*, **7**: 360-368, 1952.

KRUSZYNSKY, J. — A Cytochemical Study of Reticulocytes by Microincineration. *Acta Anat.*, **24**: 164-171, 1955.

LAJTHA, L. G. and SUIT, H. D. — Uptake of Radioactive Iron (Fe^{59}) by Nucleated Red Cells "in vitr". *Brit. J. Haematol.*, **1**: 55-61, 1955.

LAZAROW, A. and COOPERSTEIN, S. J. — Studies on the Mechanism of Janus Green B. Staining of Mitochondria. *Exptl. Cel Res.*, : 56-59, 1963.

LEONARDI P. — Valutazione e Significato delle Picnosi dei Nuclei Eritroblastici Midollari in Condizione Normali. *Haemat.*, **35**: 409-427, 1951.

LEWYS, M. R. and LEWIS W. H. — Mitochondria (and other Cytoplasmic Structures) in Tissue Cultures. *A. J. Anat.*, **17**: 339-401, 1915.

LOWENSTEIN, L. M. — Cited by L. M. Lowenstein in "Intern. Rev. Cytol.", **8** : 149, 1959.

LÜDIN, H. — SchWeiz. *Med. Wochschr.*, **36**: 842, 1949.

LUFT, J. — Improvements in Epoxy Resin Embedding Methods. J. Biophys. *Biochem. Cytol.*, **9**: 409-414, 1961.

NASSONOV, D. N. — Cited by A. J. Dalton in *"The Cell"*, **2**: 605, 1961.

NATHANS, D., von EHRENSTEIN, G., MUNRO, R. and LIPMANN, F. — Protein Synthesis from Aminoacyl-Soluble Ribonucleic Acid. *Fred. Proc.*, **21**: 127-133, 1962.

ORLIC, D., GORDON, A.S. and RHODIN, J.A.G. — An Ultrastructural Study of Erythropoietin — Induced Red Cell Formation in Mouse Spleen. *J. Ultra structure Res.*, **13**: 516-542, 1965.

PAULING, L., ITANO, H.A., SINYER, J. and WELLS, I.C. — Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. *Scienoe*, **110**: 543-548, 1949.

PEASE, D. C. — An Electron Microscopic Study of Red Bone Marrow. *Blood*, **11** : 501-526, 1956.

PERUTZ, M. F. — Submicroscopic Structure of the Red Cell. *Nature*, **161**: 204-205, 1948.

PINHEIRO, P., IEBLOND, C.P. and Droz, B. — Synthetic Capacity of Reticulocytes as show by Radioautography after Incubation with Labeled Procursors of Protein or RNA. *Exptl. Cell Res.*, **31**: 517-537, 1963.

PONDER, E. — The Paracrystalline State of the Rat Red Cell. *J. Gen. Psysiol.*, **29** : 89-102, 1945.

PONDER, E. — Red Cell Shape and Molecular Arrangement of Hemoglobin, *Blood*, **5**: 293-294, 1950.

PORTER, K. R. — Observations on a Subicroscopic Basophilic Component of Cytoplasm. *J. Exptl. Med.*, **97**: 727-750, 1953.

RAPAPORT, S., GUEST, G.M. and WING, M. — Size, Hemoglobin Content, and Acid-Soluble Phosphorus of Erythrocytes of Rabbits with Phenylhydrazine —

REYNOLDS, E.S. — The Use of Lead Citrate at High pH as an Electron Opaque Stain in Electron Microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**: 209, 1963.

RIMINGTON, C. — Connaissances Récentes sur la Biosynthèse des Porphyrines et de l'Heme. *Rev. d'Hématol.*, **12**: 591-597, 1957.

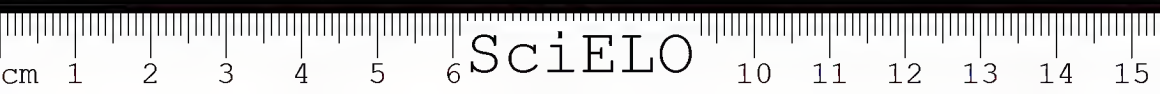
ROUILLER, C. — Physiological and Pathological Changes in Mitochondrial Morphology. *Intern. Rev. Cytol.*, **9**: 228, 1960.

RUBINSTEIN, D., OTTOLENGHI, P. and DENSTED, O.F. — The Metabolism of the Erythrocyte. XIII. Enzime Activity in the Reticulocyte. Can. *J. Biochem. Physiol.*, **34**: 222-235, 1956.

SANO, S. — Studies on the Nature of Basophilic Stippled Cell in Lead Poisoning. Report 2. Studies on the Mechanism, of Granule Formation of Basophillic Stippled Cell in Lead Poisoning. *Acta Haematol. Jap.*, **18**: 631-635, 1955.

SCHULTZ, H. UND DE PAOLA, S. D. — Cited by H. Kurozumi in "Intern. Rev Cytol., **11** : 32-33, 1961.

SENO, S., HABA, K., T. and NAKAMOTO, T. — A Method to Fix Dyes for Supravital **21** : 171-181, 1958.

SENO, S., HABA, K., T. and NAKAMOTO, T. — A Method to Fix Dyes for Supravital Staining and the Observations of Cell Organellae by this Method. *Acta Haematol. Jap.*, **21**: 332-336, 1958.

SENO, S., KAWAI, K. and NISHIKAWA, K. — Maturation of Reticulocytes and Related Phenomena. III. Maturation of Reticulocytes "in vitro"; Observation on Anemic Rabbits. *Mie. Medical Journal,* **4** (Suppl. 1):19-34, 1953.

SENO, S., MIYAHARA, M., OCHI, O., MATSUOKA, K., TOYAMA, Y. and SHIBATA, T. — oes Reticulocyte Synthesize RNA? *Acta Med. Okayama,* **17**: 253-256, 1963.

SEYFARTH, C. — *Folia Haemat.,* **34**: 7, 1923.

SIMMEL, H. — *Folia Haemat.,* **32**: 97, 1926.

SIMPSON, C. F. and KLING, J. M. — The Mechanism of Denucleation in Circulating Erythroblasts. *J. Cell Biol.,* **35**: 237-245, 1967.

SKUTELSKY, E. and DANON, D. — An Electron Microscopic Study of Nuclear Elimination from the Late Erythroblast. *J. Cell Biol.,* **33**: 625-635, 1967.

SORENSON, G. D. — An Electron Microscopic Study of Hematopoiesis in the Liver of Fetal Rabbit. *Am. J. Anat.* **106**: 27-40, 1960.

STEINERT, M. — Cited by A. Mirsky and S. Osawa in *"The Cell"*, **2**: 696-698, 1961.

SUIT, H. D., LAJTHA, L. G., OLIVER, R. and ELLIS, F. — Studies on the ^{59}Fe Uptake by Normoblasts and the Failure of X-Irradiation to Affect Uptake. *Brit. J. Haematol.,* **3**: 165-174, 1957.

THEORELL, B. — Relation entre les Modifications Cytochimiques et Cytologiques au Cours de l'Erythropoiese. *Rev. d'Hématol.,* **5**: 561-564, 1950.

THOMA, K. — Klin. Wochenschr., **28** : 215-216, 1950. Cited by Lowenstein, L.M. in *"Intern. Rev. Cytol."*, **8**: 141, 1949.

TOLEDO, C. — Considerações sôbre a Ultraestrutura de um Melanoma Maligno do Corpo Ciliar. *Rev. Bras. Oftalmol.* (no prelo).

VALLEJO-FREIRE, A. e BRUNNER JR., A. — Eritrócitos na Reticulocitose do Saturnismo Experimental. Estrutura Mitocondrial. *Mem. Inst. Butantan,* **28**: : 245-266, 1958.

WARNER, J. R., RICH, A. and Hall, C.E. — Electron Microscope Studies of Ribossomal Clusters Synthesizing Hemoglobin. *Science,* **138** (3548): 1399-1403, 1962.

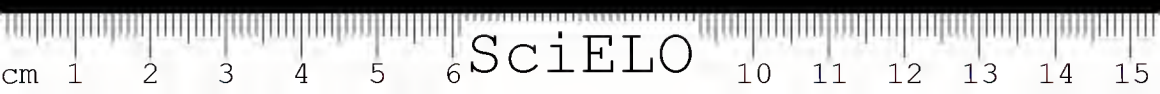
WEIGL, D. R. e KISIELIUS, J. J. — *Personel Communication,* 1967.

WEISS, L. — The Structure of Bone Marrow. Functional Interrelationships of Vascular and Hematopoietic Comportments in Experimental Hemolytic Anemia: An Electron Microscopic Study. *J. Morphol.,* **117**: 467-538, 1965.

WOLFF, J. A. and HOFE, F. H. von — Familial Erythroid Multinuclearity. *Blood,* **6**: 1274-1283, 1951.

ZAMBONI, L. — Electron Microscopic Studies of Blood Embriogenesis in Humans. II. The Hemopoietic Activity in the Fetal Liver. *J. Ultrastructure Res.,* **12** : 525-541, 1965.

ZOLLINGER, H. U. — Cytologic Studies with the Phase Microscope. II. The Mitochondria and other Cytoplasmic Constituents under Various Experimental Conditions. *Amer. J. Pathol.,* **24**: 569-589, 1948.

Recebido para publicação em 10/8/71

Mem. Inst. Butantan
35: 41-53, 1971.

ACHADOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS EM NECROSCOPIA DE PACIENTE FALECIDO POR ENVENENAMENTO ELAPÍDICO

JESUS CARLOS MACHADO * e GASTÃO ROSENFELD **
(Laboratórios de Anatomia Patológica e Fisiopatologia do Instituto Butantan).

RESUMO: Os Autores apresentam um caso de envenenamento elapídico, assinalando que a raridade de tal material justifica sua publicação. Analisam os dados clínicos e os achados de necrópsia com estudo histopatológico. Discutem o problema do achado de cilindros de hemoglobina nos rins, apesar do veneno elapídico não ser considerado hemolítico, nefrotóxico ou proteolítico. Acreditam que a morte do paciente deveu-se à insuficiência cardíaca que se instalou após o acidente. O paciente era portador de hipertensão essencial com insuficiência cardíaca crônica, fator êsse que no entender dos AA. justifica a "Causa Mortis" apesar dela ter ocorrido horas após o acidente, possibilitando a hipótese de ter sido provocada associadamente com a ação do veneno.

UNITERMOS: Envenenamento elapídico; Nefrose hemoglobinúrica.

INTRODUÇÃO

Os acidentes provocados por animais peçonhentos não são raros na medicina clínica. Já os relatos de necroscopias humanas por diversas razões que aqui escapam à análise mais objetiva, não são numerosas na literatura especializada (ver tabela 1).

Algumas espécies de serpentes, como p.e. as Crotálicas e as Botrópicas por apresentarem distribuição mais vantajosa na natureza, aliado a outros fatôres, provocam maior número de acidentes. As (corais) elapídicas, por seu pequeno porte, sua menor agressividade, por possuir pele mais vistosa, facilitando sua identificação e por apresentar aparelho bucal de menores proporções, determinam sòmente cêrca de 2,5% do total de acidentes ofídicos segundo Mc Collough e Genaro (7) e 0,29% no Instituto Butantan, segundo G. Rosenfeld (8). Dêstes acidentados pelas corais, o êxito letal ocorre em cêrca de 15 a 20%. Êsses fatos

Realizado com o auxílio do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan.
* Diretor de Divisão de Patologia.
** Ex-Chefe do Serviço de Fisiopatologia do Instituto Butantan. Chefe de Pesquisas do C.N.Pq.

Endereço para correspondência
C.P. 65, São Paulo, Brasil.

por si só demonstram a extrema dificuldade em se obter material para estudo das lesões que o veneno dessas serpentes provoca no homem. O veneno elapídico é obtido em quantidades mínimas, dificultando também estudos experimentais, pela avidez com que se o procura para produzir o anti-sôro correspondente.

Na literatura, segundo Amorim e Mello (1952), encontramos relatos de necroscopias humanas e estudos experimentais produzidos por envenenamento botrópico com Bates (1925); Mallory (1926); Roltes (1937); Mac Clure (1935); Pena de Azevedo e Teixeira (1938); Amorim e Franco de Mello (1952); e envenenamento crotálico com Mitchell (1860); Reichert (1886); Pearce (1909); Taube e Essex (1937); Fidler, Geangow e Carmichael (1940). Já, dados referentes a necroscopias humanas condicionadas por envenenamento elapídico com estudo histopatológico não encontramos referência Há um caso publicado por Vital Brazil e Vital Brazil F.º (10) com estudo necroscópico mas sem laudo histopatológico. Daí acharmos justificativa para a publicação de necroscopia com estudo histopatológico que realizamos em paciente acidentado por serpente coral e falecido em decorrência do mesmo.

MATERIAL E MÉTODOS

Caso 11.573 (1-10-1962)

O paciente (P.M.) de 50 anos, sexo masculino, côr branca, acidentou-se no litoral paulista sendo picado por uma serpente coral, provàvelmente Micrurus coralinus. Imediatamente, dado o agravamento do quadro clínico, seus familiares rumaram para o Instituto Butantan, trazendo-o para tratamento. Mas, no caminho, o paciente faleceu, seis horas e trinta minutos após o acidente. Realizamos a necroscopia, algumas horas após, tendo sido observado o que se segue:

RELATÓRIO MACROSCÓPICO DA NECROSCOPIA (S-B-911): *Realidade da morte*: esta verificou-se pelos sinais tanatológicos clássicos: rigidez cadavérica, resfriamento do corpo, opacificação da córnea, depressibilidade dos globos oculares e ausência de fenômenos vitais de respiração e circulação. *Exame externo*: cadáver de indivíduo do sexo masculino, aparentando a idade referida de 50 anos com distribuição pilosa de acôrdo com o sexo. Epiderme discretamente pálida, apresenta à altura do pé. E., na face lateral externa, lesão ulcerada recoberta por crosta hemorrágica em forma de X, medindo 2,8 x 2,7 cm. de comprimento em cada ramo, tendo a ulceração da pele uma espessura máxima de 0,7 cm. e mínima de 0,3 cm. (foto 1). Mucosa levemente descorada. *Segmento cefálico*: calota craniana — couro cabeludo sem alterações dignas de nota. Meninges transparentes, hiperêmicas com acentuação evidente do relêvo vascular. Encéfalo pesando 1.290 gr., com as circunvoluções aumentadas em espessura e comprimindo os sulcos. Ao corte, discreta saída de líquido claro que borra a emergência dos pequenos vasos encefálicos seccionados. Nada digno de nota nos núcleos da base. Pedúnculos, protuberância, bulbo, cerebelo e hipófise: nada digno de nota. *Olhos*: pupilas isocrômicas e isocóricas. *Cavidade bucal e órgãos do pescoço*: Bochechas — mucosas descoradas, rósea, e brilhante. Língua de superfície rugosa, coloração brancacenta e saburrosa. Amígdalas de superfície rugosa, irregular, de coloração rósea escura. Faringe apresentando mucosa rósea, lisa e brilhante. Cordas vocais sem nada digno de nota. Traquéia apresentando mucosa

rósea, discretamente hiperemiada. Tireóide pesando 190 gr., apresenta superfície lisa, brilhante, de côr castanha clara e consistência elástica. A superfície de corte é de côr castanha clara, vesiculada. Paratireóide e partes moles sem nada digno de nota. *Tórax*: panículo adiposo escasso. Musculatura normotrófica. Glândulas mamáreas de acôrdo com o sexo, sem nada digno de nota. Pulmões: D. pesando 550 gr. de superfície lisa, coloração rósea clara com pontos pretos, não contrátil à abertura do gradeado costal. Crepitação diminuída, principalmente nas bases. Aderências filiformes no ápice do pulmão. Pulmão E. pesando 650 gr. do mesmo aspecto que o D. Ao corte os pulmões D. e E. apresentam intensa saída de líquido claro espumoso e regular quantidade de sangue, cuja coloração é vermelho escura. Gânglios linfáticos peri-bronquiais apresentam intensa coloração escura, preta e discretamente aumentados de volume. Pleuras: superfície lisa, brilhante, transparente, apresentando à altura do ápice do pulmão D. aderências filiformes. Mediastino sem nada digno de nota. Pericárdio transparente, liso e brilhante. Conteúdo líquido claro, transparente, levemente amarelado. Coração — Miocárdio: apresenta-se de coloração vinhosa, elástico sem nada digno de nota. Endocárdio mostra-se liso, brilhante e transparente. Válvulas sigmoides aórticas apresentam discretas placas ora de um branco nacarado ora amareladas irregulares. As demais válvulas nada digno de nota apresentam. Pêso de 290 gr. Esôfago com mucosa brancacenta lisa e sem alterações dignas de nota. Cavidade abdominal: panículo adiposo normotrófico. Musculatura normotrófica. Peritôneo parietal e visceral apresentam hiperemia dos vasos que se destacam no relêvo seroso. Estômago apresenta mucosa com pregueamento íntegro, conteúdo líquido, espesso, de côr escura. Duodeno e intestino delgado e grosso, nada digno de nota. Fígado pesa 1.450 gr. e mostra superfície lisa e brilhante de côr castanha amarelada e consistência elástica. Ao corte observamos congestão vascular. Vesícula biliar cheia de bile espessa e de côr escura. À abertura, ausência de cálculos. Pâncreas pesando 190 gr., sendo de superfície lisa, brilhante e de côr castanha clara, sendo de consistência firme elástica. Ao corte nada digno de nota. Baço com superfície lisa, brilhante, de coloração cinza clara, e consistência elástica. Ao corte intensa congestão da polpa vermelha e atrofia da branca. À raspagem, saída de polpa vermelha. Rins D. e E. pesando cada um 145 gr. Apresentam superfície lisa, brilhante e de côr vermelha escura. Cápsula, não muito fàcilmente destacável, observando-se que a superfície parenquimatosa acha-se grosseiramente sulcada por depressões moderadamente profundas. Ao corte atrofia da cortical com nítida separação desta para com a medular. Nesta, observamos na parte superior, justa cortical, coloração vermelha escura que se estende até a parte medial, trajeto descendente dos túbulos das pirâmides de Malpighi. Em alguns cálices a coloração avermelhada compromete as paredes mais inferiores dos túbulos. Adrenais D. e E. superfície lisa e brilhante de côr castanha clara. Ao corte nítida delimitação da cortical e da medular notando-se nesta hiperemia vascular. A cortical apresenta côr clara deslipidizada. Ureter: mucosa brancacenta lisa e brilhante. Pélvis, bexiga, mucosa brancacenta, pregueada, lisa e brilhante. Próstata discretamente aumentada de volume, sendo de consistência elástica e coloração brancacenta. Ao corte salpicado preto, irregularmente distribuido. Trombose dos plexos venosos, peri-prostáticos. Pênis: nada digno de nota. *Membros inferiores*: Pele: já descrita a lesão do pé E. Músculos e esqueleto sem nada digno de nota. Vasos venosos: ausência de trombos. Artérias com endotélio liso, brilhante e de côr amarelada em alguns trechos. **RELATÓRIO MICROSCÓPICO**: O relatório microscópico apre-

sentou como o de maior interêsse o que se segue: Pele: necrose localizada com focos de hemorragia, disseminados. Exsudato leucocitário — polimorfonucleares neutrófilos e basófilos e histiomonócitos, com discreto edema. Rins: após pesquisa paciente encontramos alguns cilindros de hemoglobina, não muito numerosos. Inchação turva e congestão passiva crônica. Chamou a atenção a intensidade de arterio-arterioloesclerose apesar de macroscòpicamente, não se observar rim retraído. Os cilindros de hemoglobina foram mais verificados na zona intermediária, como acentuam Amorim e Mello. Pulmões: Congestão passiva crônica. Enfarte hemorrágico com embolia trombòtica de pequenos ramos da artéria pulmonar. Coração: franca hipertrofia do miocárdio. Fígado e Baço: hiperemia passiva. Adrenais hiperemia passiva. Inchação turva. Discreta adrenalite crônica inespecífica. Pâncreas: hiperemia passiva. Cérebro: intenso edema cerebral.

Dos achados macro e microscópicos poderíamos ao proceder a epicrise deduzir o que se segue: tratava-se de um paciente de 50 anos, portador de uma Hipertensão essencial benígna, já fixada, pelas alterações arteriolares encontradas, com sinais de insuficiência cardíaca — verificável pelo grau de congestão passiva dos pulmões, fígado e rins.

DISCUSSÃO

A ação dos venenos animais e das serpentes em particular, possue uma ação local e outra geral, manifestando-se à distância do ponto de inoculação (gráfico 2).

No caso que descrevemos, podemos afirmar pelos achados macro e microscópicos que se tratava de paciente de 50 anos, portador de Hipertensão essencial benígna, já fixada com lesões renais microscópicas evidentes e sinais de insuficiência cardíaca aliada a trombose venosa dos plexos peri-prostáticos. Como conseqüência local o veneno produziu pequena necrose com moderado exsudato celular e seroso. A ação à distância caracterizou-se por vaso dilatação generalizada com queda de pressão, agravamento da insuficiência cardíaca e embolia trombótica de pequenos ramos da artéria pulmonar com enfarte hemorrágico. Veio a falecer com Edema agudo pulmonar bilateral. Os achados macroscópicos de vaso dilatação, com moderada exsudação correspondente aos achados de Vital Brazil e Vital Brazil F.º (10) em caso que publicaram.

Chamou-nos a atenção a presença de alguns cilindros de hemoglobina, observados após árdua pesquisa, nos túbulos renais. Para o lado do sistema nervoso central, a única lesão evidente foi o edema cerebral.

Teríamos portanto, de analizar êstes dois aspectos, primeiro o não encontro de lesões do sistema nervoso, e segundo, a presença de cilindros de hemoglobina desde que não se tem o veneno elapídico na conta de hemolizante potente e de nefrotóxico.

Sabemos que a ação do veneno brotrópico é fortemente tóxica no local da inoculação, determinando forte necrose. Já, o veneno crotálico que localmente não produz extensas lesões, tem ação lesiva renal evidente — fator nefrotóxico — e forte fator hemolítico.

Amorim, Mello e Saliba (1965) descrevem mesmo a reprodução experimental do que chamam "Nefrose do Nefron intermediário" em cães inoculados com veneno crotálico. Antes Amorim e Mello (1954) haviam descrito estas lesões em três casos de acidente crotálico humano.

O veneno elapídico, segundo G. Rosenfeld (8), não produz lesões locais pois é pràticamente destituído de atividade coagulante e proteolítica. Afirma ser o veneno especìficamente neurotóxico proporcionando sintomatologia ligada a essa ação. Assinalamos ainda que segundo êste autor, "qualquer veneno pode provocar choque e colápso periférico" e tôda a sintomatologia daí decorrente, quando penetra na circulação em grande quantidade. Boquet e colaboradores (6) obtiveram do veneno elapídico — Najá nigricollis — após extração por GEL DEXTRANE (Sephadex G 100 fino), seis (6) frações. A neurotóxica, na sua classificação é de número seis (6). A número 1, coagula o sangue e a três inibe a coagulação. Não há referência sôbre fatôres nefrotóxicos ou cardiotóxicos. No que diz respeito à presença dos cilindros de hemoglobina, podemos analizá-los sob dois aspectos. Inicialmente sôbre se seriam realmente cilindros de hemoglobina. A descrição feita por Amorim e Mello, à página 284 (1952), a respeito da morfologia dos cilindros corrobora as observações de Baker e Doolds (1925): "os cilindros formam, assinalam os A.A. ora um bloco homogêneo ora são formados pelo amontoamento de numerosos fragmentos de estrutura homogênea; as partes ascendentes das alças de Henle chamam atenção por apresentar a luz cheia pelos cilindros de material hialino fortemente corados pela eosina". Em nosso caso, os cilindros sempre foram de aspecto homogêneo e não tão abundantes, como nos casos de acidentes crotálicos. Para a formação dos cilindros de hemoglobina são necessários pelo menos dois fatôres (gráfico 3), uma liberação de hemoglobina a partir de uma hemólise ou de uma mionecrose. As necroses musculares maciças ocorridas quando do esmagamento de membros ou "crush syndrome" em processos musculares graves, são fatôres de liberação de hemoglobina; o segundo fator será o nefrotóxico. O rim assim lesado não dissolverá os cilindros e os precipitará conforme acentuam Amorim e colab. (1965). Também outra forma de precipitação de hemoglobina seria a alteração do pH da urina. Assim é como se os reproduz experimentalmente em coelhos mantidos em dieta verde durante três dias, segundo Yorke e seus colaboradores (11).

Qual seria a origem da hemoglobina em nosso caso? Segundo vimos, Rosenfeld (8) afirma que o veneno elapídico não possui ação necrotizante porque é destituído de atividade coagulante ou proteolítica; e não há segundo Boquet (6) nos venenos elapídicos por êle estudados fração hemolítica. Estávamos nesse problema quando resolvemos em colaboração com F. Saliba estudar a ação do veneno elapídico em coelhos. Podemos antecipar, após inoculação de 12 exemplares que a ação local não é assim tão destituida de toxidade, havendo uma necrose muscular evidente, apesar do veneno ter sido inoculado subcutâneamente. Portanto, poderíamos ter aí uma possível fonte de hemoglobina.

Estamos com Amorim, Mello e Saliba (1965), quando afirmam que há necessidade de um fator nefrotóxico para se ter a cilindruria, mas acrescentaríamos a possibilidade de que, se o Rim estiver prèviamente lesado por processos patológicos anteriores, têrmos a formação de cilindros.

Procuraremos em estudos experimentais, já em andamento na Secção de Anatomia Patológica do Instituto Butantan, esclarecer êste problema.

MACHADO, J. C. e ROSENFELD, G. — Achados anátomo-patológicos em necroscopia de paciente falecido por envenenamento elapídico. *Mem. Inst. Butantan,* 35: 41-53, 1971.

SUMMARY — The authors present a case of micrurus venon noting that the rarity of such material justifies its publication. We analysed the clinical data, the autopsy findings and the histopathology. We discuss the problem of finding cilindres of hemoglobin in the kidneys, even though the micrurus venon is not considered hemolytic, nephrotoxic or proteolytic. We believe that the death of the patient was due to cardiac insuffiency that occurred after the accident. The patient suffered essential hypertension, with chronic cardiac insufficiency, a fact that, to the authors, justifies the "causa mortis", even though cardiac insufficiency occurred hours after the accident, possible hypothesis being that it was provoked by the action of the poison.

UNITERMS: Elapidic poisoning; Hemoglobinuric nephrosis.

TABELA 1

ESTUDOS EXPERIMENTAIS E RELATOS DE NECROSCOPIAS HUMANAS EM PACIENTES FALECIDOS POR ENVENENAMENTO OFÍDICO

I. **BOTRÓPICO.**

a) **NECROSCOPIAS HUMANAS**

1. Mallory (1926) 1 caso.
2. Mac Clure (1935) 1 caso.
3. Bates (1925-27) 2 casos.
4. Rotter (1937) 3 casos.
5. Azevedo Teixeira (1938) 1 caso.

b) **EXPERIMENTAL**

1. Amorim, Mello e Saliba (1952) B. Jararaca-coelho-cão.
2. Saliba (1964) B. jararaca — coelho.
3. Amorim, Mello e Saliba (1952) B.jararacussú — coelho

II. **CROTÁLICO.**

a) **NECROSCOPIAS HUMANAS**

1. Amorim e Franco de Mello (1952) 3 casos.

b) **EXPERIMENTAL**

1. Mitchell (1860).
2. Mitchell e Reichert (1886)
3. Pearce (1909)
4. Taube e Essex (1937)
5. Fidler, Glasgow e Carmichael (1940).
6. Amorim, Franco de Mello e Saliba (1951) cão.

III .**ELAPÍDICO (CORAL).**

a) **NECROSCOPIAS HUMANAS**

1. Vital Brazil e Vital Brazil F.° (1933).
2. Machado e Rosenfeld (1968).

b) **EXPERIMENTAL.**

1. Gennaro e Mc Collough (1963) (Micrurus fulvius).
2. Vital Brazil e Vital Brazil F.° (1933).
3. Machado e Saliba (1968-69).

AÇÃO DOS VENENOS DE SERPENTES EM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E NO HOMEM (2).

AÇÃO	CROTALICO	BOTRÓPICO	ELAPÍDICO
LOCAL	leve edema	Necrose do *tecido celular subcutâneo* — grave — Necrose *muscular.* — estriado — Comprometimento *vascular* — necrose da parede e do sangue — trombos.	Necrose do derma — leve —. Edema acentuado. Vaso-dilatação. *Necrose muscular estriada.*
GERAL		HEMORRAGIA em diversos órgãos. TROMBOS hialinos vasculares. (Amorim) HIALINO NECROSE vascular (humana-Rotter experimental-Amorim).	Vaso-dilatação e hiperemia com exsudação serosa.
1. Pulmão	———	**TROMBOS HIALINOS**	
2. Rim	**NEFROSE HEMOGLOBINÚRICA**	Hiperemia com hemorragia capsular. Glomerulonefrite (Mac-Clure) Necrose da Cortical dos rins.	Cilindros de Hb.
3. Vasos		Necrose.	Vaso-dilatação.

GRÁFICO 3
NEFROSE HEMOGLOBINÚRICA
- formação de cilindros de hemoglobina -
"CRUSH SYNDROME"
(esmagamento muscular)
LESÕES MUSCULARES GRAVES
TRANSFUSÕES
SANGUE INCOMPATÍVEL
VENENOS ANIMAIS
(serpentes, aranhas etc)
MIO - Hb
necrose muscular
Hb - sangue
hemólise
Hb
RIM NORMAL
EXCRETADA
(urina vermelha)
RIM LESADO
NEFROSE
HEMOGLOBINÚRICA
FATORES COADJUVANTES
1. F. Nefrotóxico
(venenos)
2. Rim Prèviamente lesado.
Arterio, arteriolo esclerose, Nefrites, Nefroses etc.
3. Alteração qualitativa da urina.
pH + ácido.

Fig. 1 — Pé D. mostrando o local do acidente elapídico.

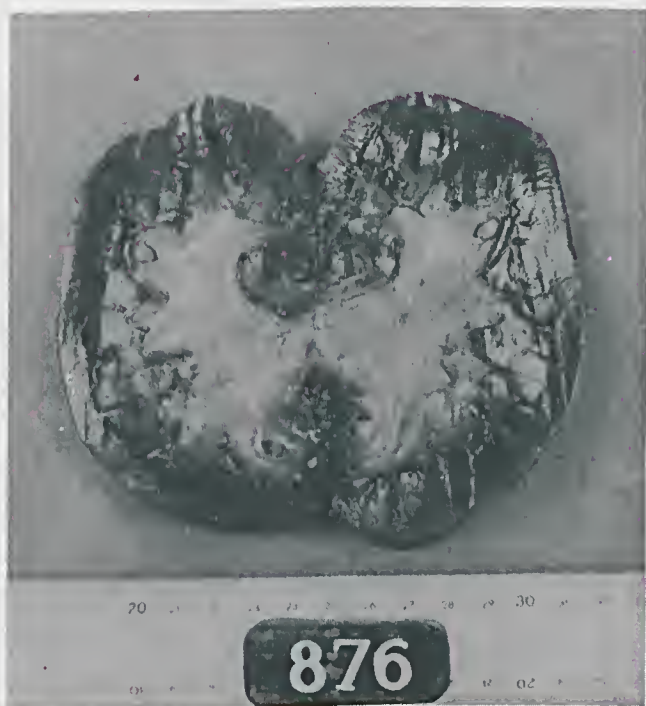



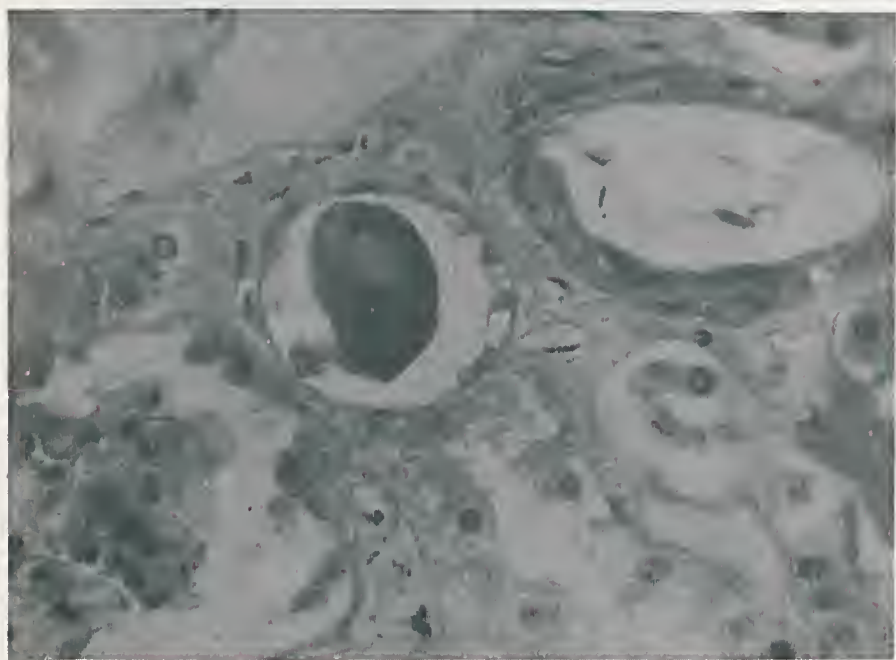
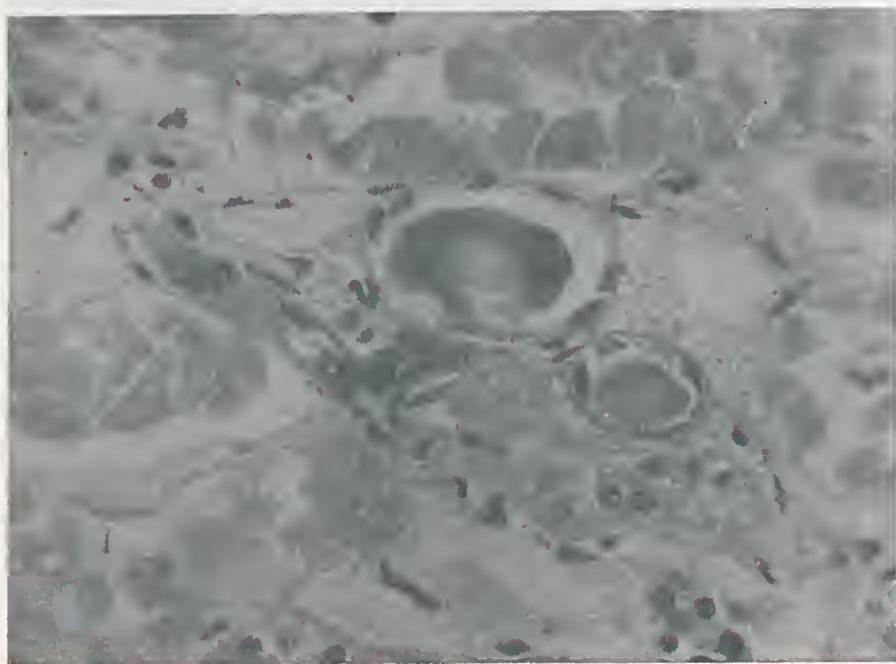
Fig. 2 — Rim D.: — Atrofia parenquimatosa com hiperplasia "ex-vacuo" do tecido adiposo da pelvis.

Figs. 3 e 4 — Rim; col. H. E. (8x45); Cilindros de hemogrobina em túbulos renais.

Fig. 5 — Rim; col. H.E. (8x45); Cilindros de hemoglobina em túbulos renais.

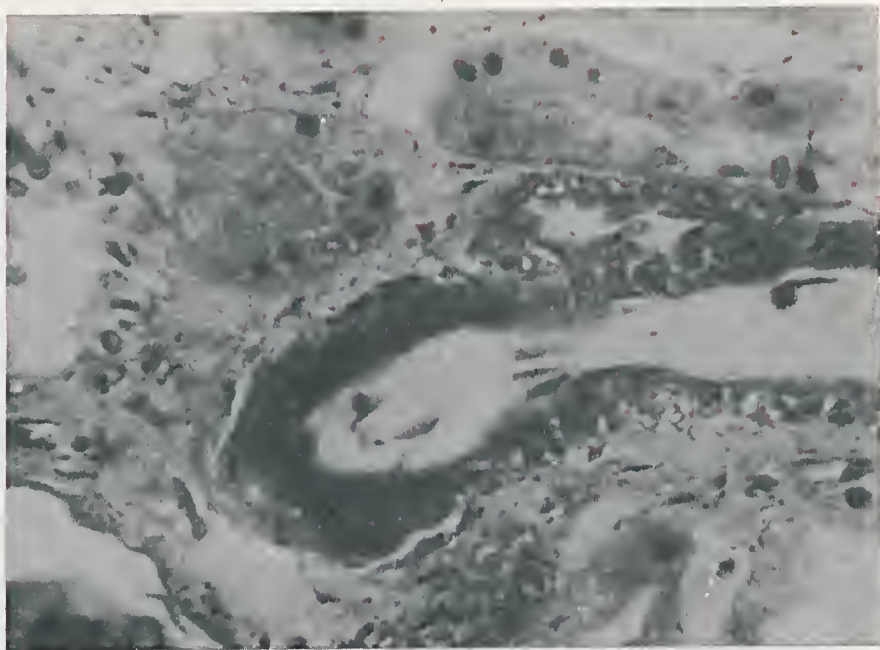



Fig. 6 — Rim; col. H.E (8 x 45): Arteriosclerose: lipoidose.

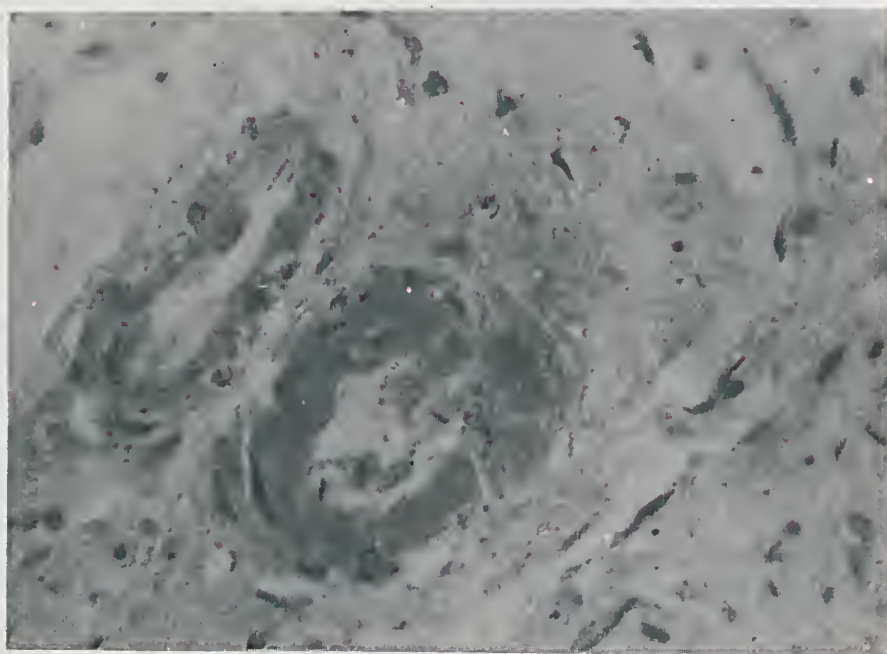



Fig. 7 — Rim; col. E. H. (8x45); Arteriolonecrose em arteríola com lipohialinose.

BIBLIOGRAFIA

1. AMORIM, M.F.; MELLO, R.F. e SALIBA, F. — Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo experimental das lesões. *Mem. Inst. Butantan*, **23**: 63/108, 1951.

2. AMORIM, M.F. e MELLO, R.M. — Nefrose do nefron intermediário no envenenamento crotálico humano. Estudo Anátomo patológico. *Mem. Inst. Butantan*, **24** (2): 281/316, 1952.

3. AMORIM, M.F. e MELLO, R.F. — Intermediate Nephron Nephrosis from Snak Poisoning in Man. *Amer. J. Path.* **30**: 479/499, 1954.

4. AMORIM, M.F.; MELLO, R.F. e SALIBA, F. — Intermediate Nephron Nephrosis Experimentally induced in the dog with crotalic venon. Anatomopathological study. *Frankfurt. Z. Path.* **75**: 87/99, 1965.

5. BAKER, S.L. and DODDS, E.C. — Obstruction of the renal tutuly during the excretion of haemoglobin. *Brit. J. exp. Path.* **6**: 247/260, 1925.

6. BOQUET, P.; IZARD, Y.; JOUANNET, M.; et MEAUME, J. — Enzymes et Toxines des Venins de Serpents. Recherches Biochimiques et Immunologiques sur le Venin de Naja nigricollis. *Mem. Inst. Butantan*, vol. XXXIII, fasc. II,: 371/378, 1966.

7. MC COLLOUGH, N.C. and GENNARO Jr., J.F. — Coral Snakes bites in the United States. *J. Fla. med. Ass.*, **39**: 968/972, 1963.

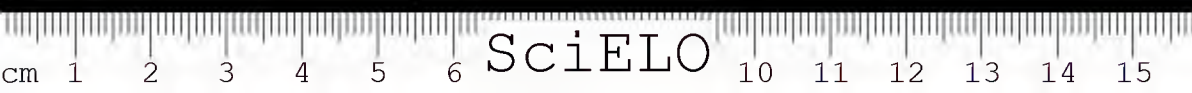
8. ROSENFELD, G. — Acidentes por animais peçonhentos. Serpentes, aranhas e escorpiões in Veronesi, R. — "Doenças infecciosas e parasitárias". Livraria Luso-Brasileira-Espanhola. S. Paulo, 2.º vol., 1960.

9. SALIBA, F. — Estudo Anátomo Patológico da evolução da necrose produzida experimentalmente por veneno de Bothrops Jararaca. Influência de substância organoheparinoide. *Mem. Inst. Butantan*, **31**: 191/200, 1964.

10. VITAL BRAZIL, O. e VITAL BRAZIL F.º, O. — "Do envenenamento elapídico em confronto com o choque anaphylático". *Bol. Inst. Vital Brasil* n.º 15, jan. 1933.

11. YORKE, W. and R.W. Naun — The mechanism of the prodution of supression of urine of biach-vater fever. *Ann. trop. Med. Parasit.* **5** :287/312, 1911.

Recebido para publicação em 27 de novembro de 1969.

Mem. Inst. Butantan
35: 55-61, 1971.

EPIDEMIOLOGY OF HODGKIN'S DISEASE IN CHILDREN. A STUDY OF 36 CASES. *

JESUS CARLOS MACHADO **, J. FRANCO DA SILVEIRA FILHO e ANTONIO D. RUSSO ***

SUMMARY: The authors presents their findings with respect to the epidemiology of Hodgkin's disease in 36 cases of children coming from the South of Brazil, on the boundaries between the tropical and temperate zones.

They produce evidence that the peak incidence occurs, in their material, at age 5/6 years, and that there is another peak at age 9. They find the male/female ratio to be 4:1. They state that the highest incidence of its clinical onset is in Autumn. Significant peaks and falls were observed in other seasons.

These findings, compared with those reported by MacMahon, Innes and Newall, and Cridland, show that both in the Northern Hemisphere and in the Southern Hemisphere, the highest incidence of Hodgkin's disease in children occurs at the end of Autumn.

In the opinion of the authors their findings corroborate the hypothesis that Hodgkin's disease is an infectious disease.

UNITERMS: Hodgkin's disease; Epidemiology on neoplastic disease; Seasonal influence on neoplastic disease.

I. — INTRODUCTION

Epidemiological studies on Hodgkin's disease being made in the Northern Hemisphere by MacMahon (8), Fraumeni and Li (5), Cridland (3), Innes and Newal (6) and others, give support to old ideas about the nature and etiology of this disease. Further studies must be made in other parts of the world to obtain more statistical data and new observations. In this paper we intend to enlarge the comparative sector concerning the epidemiology of Hodgkin's disease and to provide statistics for the Southern Hemisphere, that is, cases of Hodgkin's disease observed in children in the south of Brazil on the boundaries between the tropical and temperate zones.

---

* Study made in cooperation with the Department of Pathological Anatomy of the APCC Central Institute (Dr. A. Luisi, Director) and the Pathological Anatomy Section of the Butantan Institute, Pathology Division (Director Dr. Jesus Carlos Machado).

** Director of the Pathology Division of the Butantan Institute; Member of the WHO Internacional Reference Committee for the Classification of Lymphomas and Leukemias.

*** Fellows of the Butantan Institute Research Fund

Study made with assistence of the Butantan Institute Research Fund.

Adress
C. P. 65 — São Paulo, Brazil.

II. — MATERIAL

The data used in this study relate to 36 out of 46 cases of Hodgkin's disease recorded in the files of the Department of Pathological Anatomy of the APCC Central Institute (See Table 1). We disregarded ten cases because of lack of clinical data.

In all 36 cases the diagnosis was established by histopathological examination and reviewed by the author. The data given here were obtained from the clinical records of these patients on file at the AC Camargo Hospital.

III. — RESULTS

Table 1 shows the incidence of the cases by age, sex, and race. These data are being published separately, together with other observations on other types of malignant lymphomas. We see that in our material Hodgkin's disease affects children that are more than 4 years of age, there being only one child aged two years. The highest peak is betwen five and six years, and there is also another less pronounced, at age nine, after which the incidence of the disease diminishes. The frequency in males is much greater than in females reaching a ratio of 4:1. As expected, the highest incidence is among Caucasians and there is not a single case among Orientals and Negroes.

In Table 2, in addition to age, and sex, for the purpose of comparison we have listed associated diseases, whether or not related to Hodgkin's disease. Sometimes they are concurrent to the treatment. Thus we note that toxoplasmosis is associated with Hodgkin's disease in three cases, herpers zooster in two cases, and Kaposi Sarcoma in one, in addition to other which, in our opinion, are of less importance.

Figures 3 and 4 give the percentage data of the frequency according to the calendar month of the clinical onset of the disease. With respect to diagnosis we see that the months of highest incidence are January, February, March, July and September. Deaths occur more frequently in the months of January/February and June/July.

What is striking are the data relating to the clinical onset of the disease, that is, when the first signs or symptoms of it were observed. Figures 3 and 4 show that the highest percentage was characteristic of the months of May/June, that is, of Autumn in the Southern Hemisphere. It is also to be noted that, in all seasons, there is a rise and sudden fall of incidence.

IV. — DISCUSSION

When we compare the number of cases and the age with those presented by Fraumeni and Li (5), we see that in our material the peak incidence occurs at age 5/6, whereas for those authors its was age 9. We wish to point out that, surprisingly, after age 5-6 we also have a peak at age 9 with a subsequent decline until age 14, as occurs in the data of Fraumeni and Li (5). We believe that, in our country children are, perhaps, more exposed to infectious and parasitic agents, which would more actively excite the reticuloendothelial system and the lymphoid

tissue, thereby favoring the appearance of this incidence before age 9. In our cases the incidence in males exceeds the statistics of the above-mentioned authors. Whereas they found the ratio to be 3:1, we found it to be 4:1. For the purpose of comparison, we point out that our findings are similar to those of Junqueira Alvarenga (1) in children in the State of Minas Gerais, near São Paulo. The peak incidence occurs at age 6/7 and there is another similar peak at age 9, which subsequently declines. That author found the ratio betwen male and female incidence to be 3:1, lower than what we found. Now the data provided by Adonis de Carvalho (2) of Pernambuco, in Northeastern Brasil, are significantly different as far as incidence by sex is concerned. In his data we find a ratio of 1.5:1 (male/female). In his age table we find that the peak appears at age 6/7. We would need further data from different places before we could be certain that this variation is actually due to geographical differences, since Brazil is continental in size.

The most interesting verification relates to the variation according to seasons of the year. By plotting the clinical onset of the disease by frequency on a monthly graph, we find (Figures 1 and 2) that, in our material, the greatest frequency occurs in Autumn, and that in each season there is a peak and fall in incidence. If we construct a similar graph with the data obtained by J. F. Fraumeni and F. P. Li (5), we see that our observations coincide with those of the two above-mentioned authors. Thus we see that the highest peak is also in Autumn and there is a peak and fall in other seasons. The map shows the geographical origin of the patients, all of whom are from the south of Brazil, on the boundaries between the tropical and temperate zones.

V. — CONCLUSIONS

In addition to the conclusion which the authors (7) reached in collaboration with others namely that, among the malignant lymphomas and related diseases, excluding leukemias, Hodgkin's disease in children is the most frequent illness in Brazil, we can now add that the incidence by age in this more selected material, occurs at age 5/6, with a new peak at age 9. We believe, like Dalldorf (4), that perhaps in our country other agents can act in the direction of sensitizing the reticulo-endothelial system and inducing it more in the direction of Hodgkin's disease, in contrast to Africa, where the direction is towards Burkitt Lymphoma. With respect to sex, our male/female ratio is 4:1. The most interesting fact, in our opinion, is the influence of the seasons of the year. We observe that in our material the highest frequency of clinical onset occurs in the month of June, that is, at the end of Autumn. We note that the statistics from the Northern Hemisphere, that is, those of MacMahon (8), Innes and Newall (6), Cridland (3) also show that the highest incidence of clinical onset occurs in Autumn. Therefore, we can state that, according to our findings, Autumn is the season of the year in which the greatest number of cases of Hodgkin's disease occurs also in the Southern Hemisphere. These observations will facilitate further comparisons of speculations concerning the etiology of this disease.

MACHADO, J. C.; FRANCO DA SILVEIRA F.º, J. and RUSSO, A. D. — Epidemiology of Hodgkin's disease in children. A study of 36 cases. *Mem. Inst. Butantan*, 35: 55-61, 1971.

RESUMO: Os autores apresentam seus achados sôbre a epidemiologia da Moléstia de Hodgkin em 36 casos de crianças procedentes do sul do Brasil, nas fronteiras entre as zonas temperadas e tropical.

Há evidência de que a máxima incidência ocorre no seu material entre os 5 e os 6 anos, havendo outro pico aos 9 anos. Verificaram ser a relação masculino/feminino 4:1. Observaram que a maior incidência do início clínico da afecção é no outono.

Êstes achados, comparados àqueles relatados por MacMahon, Innes e Newall, e Cridland mostram que nos dois hemisférios da Terra, Norte e Sul, a maior incidência da Moléstia de Hodgkin em crianças ocorre no fim do outono. Na opinião dos autores êstes achados auxiliam a hipótese de ser a Moléstia de Hodgkin possìvelmente afecção a virus.

UNITERMOS: Moléstia de Hodgkin; Epidemiologia de neoplasias; Influência sazonal nas neoplasias.

TABLE 1

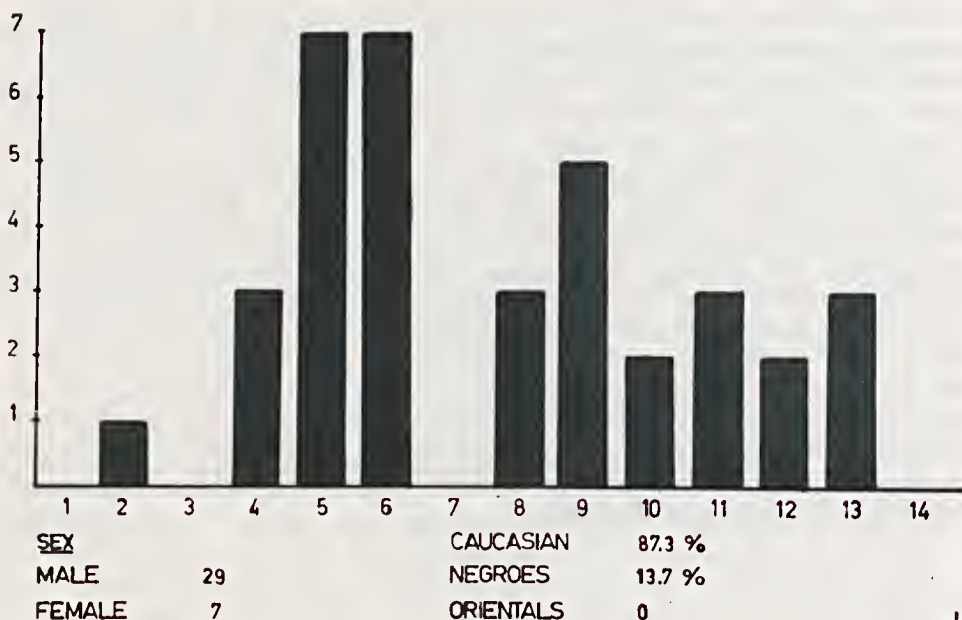



TABLE 2

Case No.	*Sex*	*Age*	*Associated Diagnosis*
1	M	5	Toxoplasmosis, Herpes zooster
2	M	9	Anemia
3	M	13	—
4	M	9	—
5	M	9	—
6	M	8	Anemia
7	F	10	—
8	F	11	Malaria
9	M	10	Kaposi's Sarcoma
10	M	9	—
11	M	5	—
12	M	5	Taxoplasmosis
13	M	6	Anemia: multiple skin lesions
14	M	5	Herpes zooster
15	F	5	Anemia: multiple skin lesions
16	M	8	Toxemic shock due to pneumonia
17	F	13	Ulcers lesions of the skin; Sarcomatosis meningea; Cushing's syndrome; Amenorrhea due to radiotherapeutical castration; Deafness; Purpura due to dyscrasia; licken planus
18	M	12	Exulcerated skin lesions
19	M	5	Anemia
20	F	2	Aplasticanemia
21	M	6	Lichen planus — lichenoid urticaria
22	M	13	—
23	M	6	—
24	M	12	—
25	M	9	—
26	M	5	—
27	M	6	Nevus juvenil
28	M	8	Impetigo
29	M	11	—
30	M	6	—
31	M	6	Anemia
32	M	4	—
33	M	4	—
34	F	11	—
35	M	4	Nephritis due to iradiation — Toxoplasmosis
36	M	6	—

MACHADO, J. C.; FRANCO DA SILVEIRA F.º, J. and RUSSO, A. D. — Epidemiology of Hodgkin's disease in children. A study of 36 cases. *Mem. Inst. Butantan,* 35: 55-61, 1971.

HODGKIN'S DISEASE IN CHILDREN

Seasonal influence

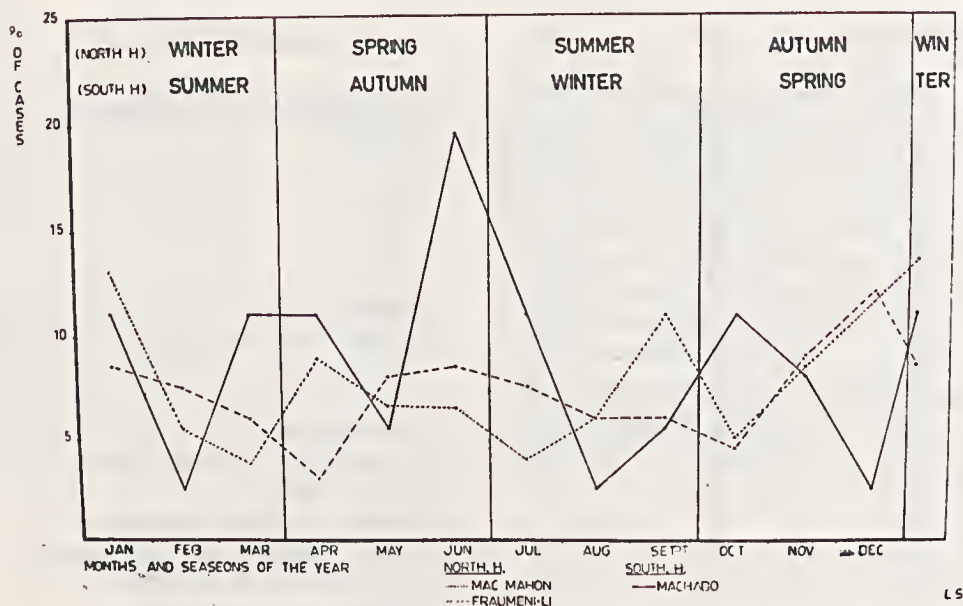



Fig. 3

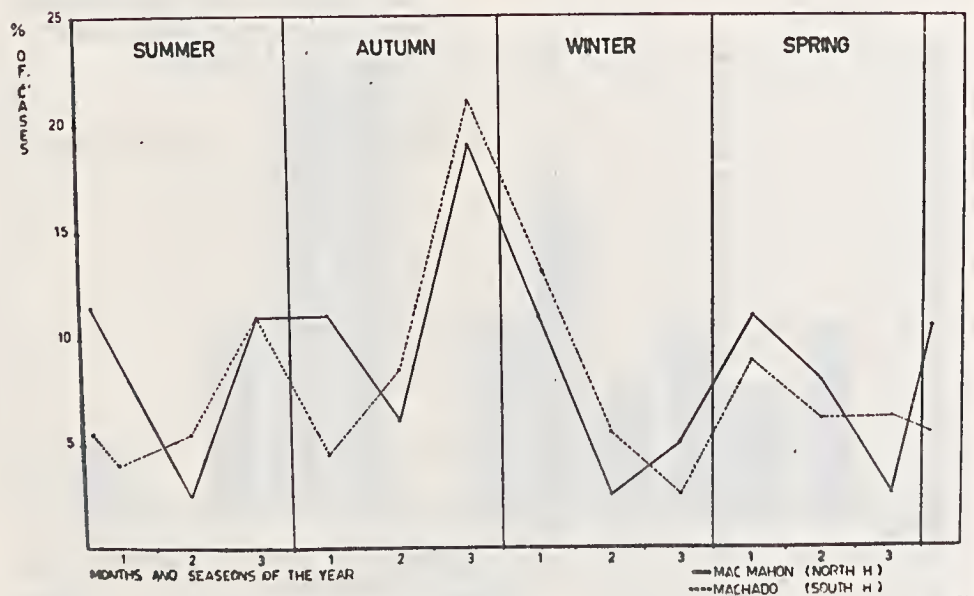



Fig. 4

BIBLIOGRAPHY

1. ALVARENGA, R. Junqueira: Relatório aos Congressos Integrados de Cancerologia, na mesa redonda sôbre: "Patologia geográfica dos Linfomas Malígnos e afecções correlatas em crianças no Brasil" setembro, 1969.

2. CARVALHO, Adonis de: Relatório aos Congressos Integrados de Cancerologia, na Mesa Redonda sôbre: "Patologia geográfica dos Linfomas Malígnos e afecções correlatas em crianças no Brasil", setembro, 1969.

3. CRIDLIAND, M.D.: Seasonal incidence of clinical onset of Hodkin's disease. *Brit. med.* J. 2: 621-623, 1961.

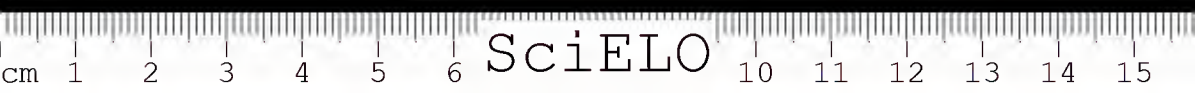
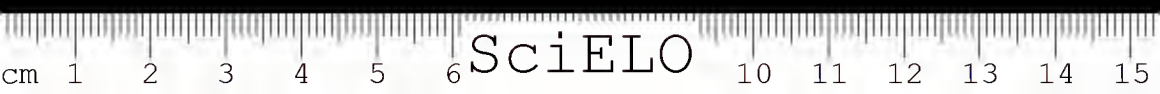
4. DALLDORF, G.: Lymphomas of African children with different forms of environmental influences. *J. Amer. med. Ass.* 181: 1026-1028 (1962).

5. FRAUMENT, Jr. J. and *LI*, F. P.: Hodgkin's Disease in Childhood: An Epidemiologic study; *J. nat. Cancer Inst.* 42: 681-691, 1969.

6. INNES, J. and NEWALL, J.: Seasonal incidence in clinical onset of Hodgkin's disease. *Brit. med.* J. 2: 765 (1961).

7. MACHADO. J. C.; CARVALHO, A.; JUNQUEIRA, Alvarenga, R.; PINHEIRO, L.; FAGUNDES, L. A.; LYSANDRO: Patologia geográfica da Moléstia de Hodkin em crianças no Brasil. *Rev. bras. Cirurg.* (No prelo).

8. MAC MAHON, B.: Epidemiology of Hodgki's disease. *Cancer Res.* 26: 1189-1200 (1966).

Recebido para publicação em 10 de agôsto de 1971

Mem. Inst. Butantan
35: 63-78, 1971.

"ALTERAÇÕES DO EPITÉLIO E ESFREGAÇOS VAGINAIS DA PREÁ (Cavia aperea aperea) DURANTE O CICLO ESTRAL E ESTUDO COMPARATIVO COM AS DA COBAIA". *

JOSÉ FRANCO DA SILVEIRA FILHO ** e JESUS CARLOS MACHADO ***
(Seção de Anatomia Patológica, Instituto Butantan)

RESUMO: A preá *(Cavia aperea aperea)* nascida em cativeiro apresenta ciclo sexual (duração de 13 a 17 dias) muito semelhante ao da cobaia e foi por nós dividido em 2 partes, de acôrdo com o aspecto do esfregaço vaginal: estro ou fase de atividade sexual (26 a 56 horas) e diestro ou fase de repouso (10 a 15 dias). Durante o estro que subdividimos em 4 estágios a população celular do epitélio vaginal apresenta intensa proliferação, diferenciação e descamação. Inicialmente ocorre mucificação das células superficiais e posteriormente queratinização das células subjacentes à camada mucificada. As células superficiais mucosas tornam-se picnóticas e descamam intensamente, seguindo-se a descamação das células queratinizadas. O final do estro é caracterizado por intensa leucocitose em tôda a parede da vagina. No diestro o epitélio vaginal apresenta-se delgado e não podemos dividí-lo em zonas tal como o estro.

Discutimos os resultados obtidos levando em conta o estado endócrino do indivíduo, principalmente o aspecto dos ovários.

UNITERMOS: Cavia aperea aperea; Colpocitologia hormonal.

INTRODUÇÃO

O Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Butantan iniciou em 1969 a organização de um biotério destinado a criação e manutenção de preás em cativeiro, como tentativa de estudo sistemático da preá como animal de laboratório. Êste roedor foi utilizado, tempos atrás, por von Ubisch e Amaral, 1936, e por Bueller-Souto e von Ubisch, 1939, em experimentos imunológicos e por von Ubisch e Mello, 1940, em experimentos genéticos. Recentemente, Castro e colaboradores, 1961, e Miranda e colaboradores, 1967, utilizaram a preá em estudos leprológicos. Finalmente, Dellias, 1969, estudou alguns aspectos da biologia da preá e neste mesmo trabalho abordou o seu ciclo estral. Antes dêle, von

* Trabalho realizado com o auxílio do F.P.I.B.
** Bolsista da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Butantan.
*** Diretor da Divisão de Patologia do Instituto Butantan.

Enderêço para correspondência
C.P. 65, São Paulo, Brasil

Ubisch e Mello, 1940, fizeram êsses estudos em animais provenientes diretamente do campo. Assim não puderam controlar certas variáveis importantes em um estudo desta natureza tais como: a idade das fêmeas, se elas eram virgens ou não, se já tinham procriado e no caso afirmativo quantas vêzes (Stockard e Papanicolaou, 1917, e Papanicolaou, 1933 a). Também permanecia em aberto a questão de como seria o ciclo sexual das preás nascidas em cativeiro.

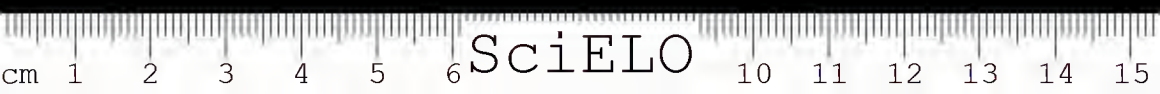
Tendo em vista esclarecer êsses pontos e comparar o ciclo sexual da preá com o da cobaia, realizamos estudo sistemático das alterações cíclicas do epitélio e esfregaço vaginais de preás nascidas em cativeiro. Para realizá-lo foi necessário reformulação da classificação dos esfregaços vaginais apresentada por Dellias, 1969, pois constatamos a presença de alguns tipos celulares no esfregaço vaginal que foram omitidos por êsse autor. Também no que diz respeito a duração das fases do ciclo estral, nossas observações diferem em alguns aspectos das de Dellias, 1969.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos em nosso trabalho 12 preás fêmeas nascidas no biotério. Destas, 9 eram virgens e foram mantidas antes e durante a experimentação na ausência de macho. As outras 3 fêmeas foram submetidas ao exame vaginal 2 meses após terem dado cria e, foram mantidas durante a gestação e o período de experimentação na ausência de macho. As preás virgens tinham idade variável entre um mês e meio até 10 meses quando foram examinadas, ao passo que, as outras 3 tinham mais de um ano de idade. Para estudo comparativo tomamos 1 lote de 10 cobaias fêmeas virgens, cuja idade variou de 3 a 10 meses de idade, e que foram examinadas concomitantemente com as preás. As preás e as cobaias foram examinadas durante 8 meses (julho de 1970 a fevereiro de 1971).

Os esfregaços vaginais foram executados diàriamente procedendo-se uma ligeira raspagem do epitélio vaginal com alça metálica. Os esfregaços eram imediatamente fixados em álcool-éter 50% e corados pelo Método de Harris-Shorr (Pundel, 1967). A avaliação dos elementos presentes no esfregaço foi feita segundo método proposto por Lipschütz, 1929, e utilizado com bons resultados por Mello e Franke, 1945. Quando percebíamos que um animal aproximava-se do estro, êle era submetido a esfregaços vaginais a intervalos de 2 em 2 horas até 22 hrs., sendo reiniciados no dia seguinte às 7:30 horas. Desta maneira tôdas as fases do estro puderam ser estudadas, até mesmo, aquelas que como observamos podem ter apenas 2 horas de duração.

Os animais foram sacrificados nas diferentes fases do ciclo estral. Sistemàticamente foram executados esfregaços vaginais imediatamente antes dos animais serem sacrificados. Tôda a genitalia foi fixada em Bouin, para posteriormente, serem obtidas secções da vagina e dos ovários, os quais foram incluídos em parafina.

Os cortes histológicos foram corados pelos Métodos de Mallory e Hematoxilina-Eosina. Também, utilizamos a coloração indicativa Alcian-Blue, pH=2,5 (Lison, 1960) com a finalidade de melhor evidenciar a presença de células mucosas no epitélio vaginal.

RESULTADOS

Para a descrição das alterações cíclicas do esfregaço vaginal da preá adotaremos classificação baseada naquelas apresentadas por Selle, 1922; Young, 1937; e Bacsich e Wyburn, 1939, para a cobaia. Segundo a análise do esfregaço vaginal nós podemos dividir o ciclo sexual das preás em 2 partes distintas: *estro* ou fase de atividade sexual, na qual o opérculo vaginal encontra-se aberto e *diestro* ou fase de repouso, na qual o opérculo vaginal apresenta-se fechado por uma membrana que foi descrita por Dellias, 1969. Esta membrana encontrada na preá é semelhante à membrana que fecha o opérculo vaginal da cobaia durante o diestro. (Stockard e Papanicolaou, 1919, e Kelly e Papanicolaou, 1927).

O estro na preá segundo os nossos dados tem uma duração de 26 à 56 horas, a média para 12 preás foi de 39,1 horas. Nós dividimos o estro em 4 diferentes estágios.. O esfregaço vaginal e o aspecto do epitélio vaginal de cada fase, bem como sua correlação com a cobaia serão descritos a seguir:

Estágio 1 — (duração de 12 a 42 horas; duração média de 22,0 horas). Para o cálculo da duração das diferentes fases computou-se os dados obtidos em 12 preás.

Marca o início do estro. Corresponde na cobaia ao estágio 1 de Selle, 1922, a subdivisão Ia e Ib inicial do estágio 1 de Young, 1937, e ao estágio 1 de Bacsich e Wyburn, 1939. Inicialmente, o esfregaço vaginal da preá no estágio 1 caracteriza-se por apresentar grande quantidade de células epiteliais superficiais mucosas, poucos leucócitos e quantidade relativamente grande de muco. As células superficiais mucosas apresentam citoplasma bastante volumoso (ocupando quase totalmente a célula), vacuolizado, que se cora de azul claro ou, às vêzes, de rôxo claro pelo Método de Harris-Shorr. O núcleo de cromatina densa, geralmente encontra-se comprimido na base da célula, à maneira das células mucosas (fig. 1). Mesmo no início do estágio 1 algumas células superficiais mucosas já apresentam núcleo em picnose. As células superficiais mucosas encontram-se no esfregaço vaginal isoladas ou em grupos de muitas células lembrando o arranjo que ocupavam no epitélio vaginal, sendo êste último caso mais comumente encontrado. A medida que o estágio 1 progride verificamos no esfregaço vaginal aumento no número de células superficiais mucosas com núcleo em picnose e o desaparecimento dos leucócitos (fig. 2). As células mucosas picnóticas apresentam citoplasma delgado e com bordos dobrados, que se cora de azul muito pálido pelo Método de Harris-Shorr. Podemos notar no citoplasma granulações espêssas dando-nos a impressão de que quando a célula sofre picnose nuclear, ela apresenta aumento destas granulações citoplasmáticas. No fim do estágio 1 o esfregaço vaginal contém grande quantidade de células superficiais mucosas picnóticas e uma quantidade relativa de células queratinizadas e de muco. As células mucosas que não sofreram picnose e os leucócitos estão pràticamente ausentes. A presença de células superficiais mucosas não picnóticas e picnóticas no início do estro foi omitida por Dellias, 1969.

No estágio 1 do estro o epitélio vaginal apresenta-se com a sua máxima espessura e podemos dividí-lo em 3 diferentes zonas: germinativa, basal e superficial.A zona germinativa, que está em contacto com o estroma vaginal, é formada por uma camada de pequenas células cilíndricas com núcleos grandes e ova-

lados ocupando grande parte da célula. A zona germinativa apresenta grande número de mitoses no estágio 1. A zona basal é formada por muitas camadas de células ovaladas ou poliédricas com núcleos grandes, vesiculares tendo um nucleólo bem evidente (fig. 1 e 2). Estas células apresentam conexões em suas superfícies, processos espinhosos semelhantes aos descritos na epiderme humana e no epitélio vaginal da mulher (Pundel, 1967). Na cobaia, Tribby, 1943, também comprovou a existência de pontes intercelulares entre as células do epitélio vaginal. Notamos, ainda na zona basal um grande número de células binucleadas. A zona superficial durante o estágio 1 pode ser subdividida em 2 camadas: uma formada por células superficiais mucosas que estão em contacto com o lúmen vaginal e outra subjacente, formada por células queratinizadas ou em vias de queratinização. Êste aspecto da zona superficial do epitélio vaginal no início do estro, também, foi descrita na cobaia (Selle 1922) e na rata (Long e Evans, 1922). Na metade do estágio 1 sòmente uma pequena porção da parede da vagina próxima ao opérculo vaginal não apresenta a camada queratinizada. Nesta região o epitélio vaginal é menos espêsso e não se notam tôdas as suas zonas, de modo que a camada de células superficiais mucosas repousa diretamente na zona basal (fig. 1). No restante da vagina as células mucosas apresentam-se dispostas sôbre a camada queratinizada formando estruturas que lembram os ácinos mucosos. As características morfológicas de tais células foram descritas anteriormente. No final do estágio 1, as células mucosas apresentam núcleos picnóticos e descamam intensamente fornecendo as células encontradas no esfregaço vaginal. Sòmente, a camada de células mucosas da zona superficial cora-se com o Alcian-Blue, tanto no início do estágio 1, como no seu fim quando as células superficiais mucosas apresentam-se picnóticas.

A camada queratinizada já está completamente formada no fim do estágio 1 e reveste completamente tôda a vagina. Entre a camada basal e a camada queratinizada notamos, freqüentemente, existência de uma camada com uma ou duas células de altura que contém quantidade razoável de densas granulações citoplasmáticas coráveis pela hematoxilina.

O estroma vaginal (lâmina própria de tecido conjuntivo) durante o estágio 1 apresenta-se com poucos leucócitos polimorfonucleares, sendo que alguns leucócitos já alcançaram a zona germinativa do epitélio. Notamos algumas mitoses no tecido conjuntivo do estroma. No início do estágio 1 podemos encontrar alguns leucócitos no lúmen vaginal, mas no seu final êles são raros.

Estágio 2 — (duração de 3 a 10 horas; duração média de 5,8 horas). Corresponde na cobaia ao estágio 2 de Selle, 1922, a subdivisão Ib médio e Ib final do estágio I de Young, 1937, e ao estágio II de Baesich e Wyburn, 1939. O estágio 2 da preá é caracterizado pela presença preponderante de células superficiais queratinizadas no esfregaço vaginal. No início do estágio 2, temos juntamente com as células queratinizadas a presença de pequena quantidade de células superficiais mucosas em picnose, remanescentes do estágio anterior e, uma quantidade pequena de muco. As células queratinizadas apresentam citoplasma largo, delgado e com bordos dobrados, que se cora intensamente de alaranjado (orange) pelo método de Harris-Shorr, portanto são células eosinófilas ou acidófilas (Pundel, 1967). Geralmente, as células queratinizadas são anucleadas podendo-se perceber no citoplasma um halo que foi anteriormente ocupado pelo núcleo. Algu-

mas células queratinizadas apresentam o núcleo em picnose, ocupando normalmente a parte central da célula. As célula queratinizadas descamam isoladas ou então em grupos de muitas células. No fim do estádio 2, começam a aparecer no esfregaço vaginal as células epiteliais basais provenientes da zona basal do epitélio vaginal. Dellias, 1969, também encontrou células queratinizadas no esfregaço vaginal da preá em estro.

No estágio 2, o epitélio vaginal apresenta-se com sua espessura diminuida devido à descamação das células superficiais mucosas, deixando a camada queratinizada em contacto com o lúmen vaginal (fig. 3). Em alguns pontos da vagina a camada queratinizada descama-se de uma só vez, aliás, tal fato também foi observado por Selle, 1922, na cobaia. A zona germinativa apresenta grande número de mitoses e a zona basal apresenta-se tal como no estágio anterior. No fundo das pregas da vagina inferior nós vamos encontrar ainda células superficiais mucosas não picnóticas e picnóticas. Tal fato pode ocorrer também, nos estágios 3 e 4. O epitélio vaginal ou seja a camada queratinizada da zona superficial, a zona basal e a zona germinativa não se coram com o Alcian-Blue. Sòmente aquêles trechos do epitélio vaginal que ainda possuem células superficiais mucosas é que são evidenciadas pela coloração de Alcian-Blue, no estágio 2.

O estroma vaginal acha-se ligeiramente edemaciado e invadido por poucos leucócitos. Alguns leucócitos já penetram na zona germinativa e na zona basal do epitélio, porém, no lúmen vaginal êles são extremamente raros.

Estágio 3 — (duração de 2 a 9 horas: duração média de 4,8 horas). Corresponde na cobaia ao estágio 3 de Selle, 1922, ao estágio 2 de Young, 1937, e ao estágio 3 de Bacsich e Wyburn, 1939. O estágio 3 da preá é caracterizado pela presença no esfregaço vaginal de grande quantidade de células epiteliais basais. No fim do estágio 2 começam a aparecer no esfregaço vaginal as células basais, cujo número torna-se preponderante no estágio 3. Em alguns estros examinados, o estágio 2 confundiu-se com o estágio 3, devido ao grande número de células basais e queratinizadas presentes no esfregaço. Nêstes casos, nós consideramos o início do estágio 3 quando 50% das células presentes no esfregaço eram células basais (tal procedimento foi realizado por Young, 1937 na cobaia). O fim do estágio 3 é marcado pelo advento de leucócitos no esfregaço vaginal. Nos esfregaços do estágio 3 existe pequena quantidade de muco. As células epiteliais basais são células pequenas, redondas ou ovaladas, cujo citoplasma se cora em verde escuro ou em alguns casos de azul escuro pelo Método de Harris-Shorr, podemos então classificá-las como células cianófilas ou basófilas (Pundel, 1967). No citoplasma de algumas destas células notamos uma ou mais granulações. O núcleo de forma ovalada ou arredondada é bastante grande ocupando a região central da célula. Apresenta cromatina homogênea e nucléolo bem definido (fig. 4). As células basais do esfregaço do estágio 3 podem apresentar sinais de degeneração. Umas apresentam vacúolos perinucleares envolvendo núcleos parcialmente picnóticos, outras apresentam vacúolos no citoplasma, o que é um sinal de início de degeneração celular (fig. 4). Algumas células basais apresentam leucócitos no seu interior. As células basais comumente descamam isoladas, podendo também descamar em grupo de muitas células. Um fato que nos chamou a atenção foi o número relativamente grande de células basais binucleadas presentes no esfregaço do estágio 3. A presença de células basais ou seja o nosso estágio 3, passou despercebida a Dellias, 1969.

Durante o estágio 3, o epitélio vaginal apresenta-se com espessura menor do que a do estágio anterior. Agora, a zona basal é que está em contacto com o lúmen vaginal. Na zona germanativa as mitoses são raras. Fazendo uma análise da parede da vagina em tôda a sua extensão, verificamos que existem pequenos trechos do epitélio vaginal que ainda apresentam células queratinizadas e células mucosas picnóticas. O epitélio vaginal constituído pela zona basal e germinativa não se coram com o Alcian-Blue, de modo que sòmente aquêles trechos que ainda possuem células mucosas picnóticas é que se coram com o Alcain-Blue.

No estágio 3 há aumento de leucócitos presentes no estroma vaginal que se encontra ligeiramente edemaciado. O epitélio vaginal acha-se parcialmente invadido pelos leucócitos, podendo-se notar células basais com leucócitos no seu interior. Apesar disso, apenas no fim do estágio 3 é que os leucócitos começam a aparecer no lúmen vaginal.

Estágio 4 — (duração de 8 a 20 horas; duração média de 12,2 horas). Corresponde na cobaia ao estágio 4 de Selle, 1922, ao estágio 3 de Young, e ao estágio 4 de Bacsich e Wyburn, 1939. O estágio 4 da preá é caracterizado pela presença no esfregaço vaginal de grande quantidade de células basais e polimorfonucleares. No início dêste estágio, o esfregaço vaginal é composto de grande quantidade de células basais e leucócitos, e às vêzes, de pequena quantidade de células mucosas picnóticas e queratinizadas que ainda se encontram no lúmen vaginal. O muco está presente em pequena quantidade no esfregaço. As células basais apresentam as degenerações descritas anteriormente: vacúolos perinucleares envolvendo núcleos picnóticos e vacúolos citoplasmáticos que são prenúncios de degeneração celular. À medida que o ciclo progride tais degenerações são mais acentuadas e são detectadas em um maior número de células basais. A partir da metade do estágio 4, a grande maioria das células basais presentes no esfregaço vaginal apresentam núcleo em picnose. Tais células coram-se em verde escuro pelo Método de Harris-Shorr, ou então, mais raramente em vermelho escuro. No fim do estágio 4 o número de células basais é bastante reduzido. Quase tôdas as células estão degeneradas, certamente devido à ação fagocitária dos leucócitos. A maioria das células basais apresentam núcleos picnóticos, notando-se também a presença de células basais em cariorrexix e células basais totalmente vacuolizadas. Células basais com um ou mais leucócitos no seu interior ocorrem durante todo o estágio 4 e são uma das características dêste estágio, embora, possam ocorrer no esfregaço do estágio 3, como já afirmamos anteriormente. Tais células apresentam núcleo e citoplasma em degeneração, coram-se difusamente pelo Método de Harris-Shorr e são semelhantes àquelas descritas na cobaia (Stockard e Papanicolaou, 1917 e Stockard, 1932). O estágio 4 também foi descrito por Dellias, 1969.

Secções da vagina durante o estágio 4 mostram o estroma e o epitélio vaginal totalmente tomados por um grande número de leucócitos, os quais deixam os leitos dos capilares, atravessam o epitélio vaginal e vão ter no lúmen da vagina (fig 5). O epitélio vaginal apresenta-se com a zona basal e germinativa, e à medida que o ciclo progride a zona basal vai tornando-se cada vez menos espêssa e mais colapsada, devido à descamação das suas células e à ação leucocitária (fig. 5). As camadas basal e germinativa dão reação negativa ao Alcian-Blue e as mitoses estão ausentes. O estroma vaginal apresenta-se extremamente edemaciado.

O epitélio vaginal emite algumas projeções que adentram no estroma vaginal. A zona germinativa e as células basais nestas projeções parecem não sofrer injúrias devido à ação leucocitária. Talvez, isto tenha papel importante na reconstituição do epitélio vaginal após a intensa descamação de suas células e a leucocitose fisiológica que caracterizam o estro. Esta idéia também foi apoiada por certos autôres na cobaia (Stockard e Papanicolaou, 1917, e Selle, 1922).

Em duas preás sacrificadas no início do estágio 4 observamos que pequeno trecho do epitélio vaginal, próximo ao opérculo vaginal, apresentava células superficiais mucosas dispostas diretamente sôbre a zona basal. Evidentemente, êste curto trecho do epitélio vaginal não sofreu queratinização mas sòmente mucificação. Nas demais regiões da vagina dessas preás podemos perceber nìtidamente restos da camada queratinizada no lúmen vaginal. Isto explica o aparecimento de células superficiais mucosas bem conservadas em alguns esfregaços do estágio 4.

Verificamos, também, a ocorrência de alguns estros que apresentam leucócitos em tôdas as fases. Isto foi também observado na cobaia por Young, 1937.

O diestro na preá tem a duração de 10 até 15 dias, a média para 12 preás foi de 13,1 dias. O diestro pode ser dividido em 2 partes levando-se em conta o aspecto do esfregaço vaginal.

Diestro 1 (duração de 5 a 10 dias; duração média de 6,4 dias).

O esfregaço vaginal do diestro 1 é, geralmente pobre tanto em elementos celulares como acelulares. Porém, podemos caracterizá-lo pela presença de uma quantidade razoável de muco e leucócitos e, pequena quantidade de células epiteliais e restos de células basais, provenientes do estro anterior. A medida que o diestro 1 progride a quantidade de restos de células basais vai diminuindo cada vez mais. As células epiteliais diestrais são células pequenas, redondas ou ovaladas, com citoplasma que se cora de azul pálido pelo Método de Harris-Shorr. Apresentam núcleo ovalado ou arredondado, com cromatina homogênea e nucléolo bem definido. O núcleo, que é relativamente grande ocupa geralmente a posição central da célula. As células epiteliais diestrais encontram-se isoladas no esfregaço vaginal do diestro 1.

O epitélio vaginal durante o diestro 1 apresenta-se delgado não permitindo divisão em zonas tal como fizemos no estro. O lúmen vaginal no diestro é bastante pregueado e o seu diâmetro é notadamente menor do que o diâmetro visto no período de atividade sexual. O epitélio vaginal emite projeções que penetram no estroma vaginal. Nas regiões mais delgadas, o epitélio vaginal apresenta uma ou duas camadas de células de altura. A zona germinativa é perfeitamente distinguível no epitélio diestral e nela notamos algumas mitoses. As células epiteliais que estão em contacto com o lúmen vaginal podem ser achatadas ou alongadas, ou então de forma cuboidal. Algumas destas células de forma cuboidal apresentam citoplasma vacuolizado e dão reação positiva ao Alcian-Blue, acusando a presença de muco (fig. 6). Tribby, 1943, observou a presença de células epiteliais contendo muco na superfície do epitélio vaginal diestral da cobaia. Devemos acrescentar ainda, que nas regiões próximas ao opérculo vaginal, o epitélio vaginal da preá apresenta-se mucificado. Aí nós vamos encontrar células superficiais mucosas, semelhantes aquelas descritas no estágio 1 do estro.

O estroma vaginal no diestro 1 apresenta-se ligeiramente edemaciado e invadido por poucos leucócitos. Podemos surpreender alguns leucócitos no epitélio vaginal e no lúmen vaginal.

Diestro 2 (duração de 5 a 10 dias; duração média de 6,5 dias).

No enfregaço vaginal do diestro encontramos uma quantidade bem maior em relação ao diestro de: células epiteliais diestrais, leucócitos e muco. A principal característica do esfregaço do diestro 2 é a descamação das células diestrais em grupos de muitas células e a presença de algumas figuras de mitose. Podemos notar também, células diestrais com leucócitos no seu interior.

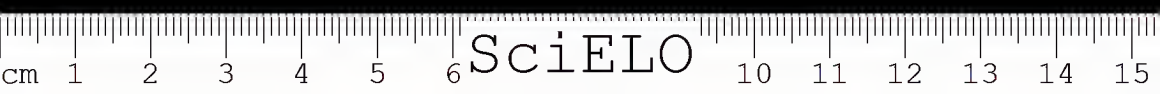
Um ou dois dias antes do estro há no esfregaço vaginal diminuição na quantidade de leucócitos e de células diestrais e, aumento na quantidade de muco e o aparecimento das primeiras células superficiais mucosas do estro.

O epitélio vaginal, no início do diestro 2 apresenta-se com espessura menor do que qualquer outra fase do ciclo estral (fig. 7). Selle, 1922, verificou o mesmo na cobaia. Muitas mitoses podem ser observadas tanto na zona germinativa como nas camadas superficiais. Podemos surpreender figuras de mitose em células que estão em contacto com o lúmen vaginal, prestes a descamarem. Nas regiões mais delgadas o epitélio vaginal apresenta-se com espessura de uma ou duas camadas de células de altura. No início do diestro 2, o epitélio vaginal dá reação negativa ao Alcian-Blue.

O estroma vaginal acha-se invadido por leucócitos, cuja quantidade é bem superior àquela vista no diestro 1. Os leucócitos atravessam o epitélio vaginal e vão ter no lúmen da vagina.. Em quase tôda extensão da vagina, as células epiteliais das camadas superficiais apresentam leucócitos no seu interior (fig. 7). Um dia antes de iniciar-se o estro, o epitélio vaginal apresenta-se com a sua espessura aumentada e as células superficiais já exibem o processo de mucificação.

Algumas vêzes, obtivemos tanto no diestro 1 como no diestro 2, esfregaços vaginais contendo quantidade enorme de muco filamentoso e leucócitos, e raras células epiteliais. Em alguns casos é tal a quantidade de muco e leucócitos no lúmen da vagina que a membrana diestral que fecha o opérculo vaginal se rompe e o material purulento se estravasa. Com exceção dêstes casos, no diestro o opérculo vaginal está obliterado por uma membrana.

DISCUSSÃO

O ciclo estral da preá nascida em cativeiro é extremamente semelhante ao da cobaia (Selle, 1922, Young, 1937, Bascich e Wyburn, 1939), existindo perfeita correlação entre os estágios do ciclo estral dêstes dois roedores. A seqüência e duração dêstes estágios também é semelhante ao da cobaia. O ciclo sexual da preá tem a duração de 13 a 17 dias, raramente, temos ciclos de 12 ou 18 dias. A média foi de 14,9 dias, bastante próxima à da cobaia (Stockard e Papanicolaou, 1917 e Selle 1922). Não notamos diferenças entre o ciclo sexual das preás virgens e daquelas examinadas após a parturição. Por êsse aspecto acreditamos que a preá nascida em cativeiro reproduz-se normalmente.

Para nossos estudos foi necessário reformular a classificação de Dellias, 1969. Êste autor omitiu o estágio 1 do estro quando ocorre mucificação do epitélio vaginal. Êle diz ter encontrado no início do estro células ovaladas com núcleo grande e central. Nas nossas observações nunca deparamos com tais células no esfregaço vaginal do início do estro. Também, passou desapercebido a Dellias a presença de células epiteliais basais no esfregaço do estro ou seja como descrevemos no estágio 3. Provàvelmente, isto ocorreu devido a curta duração do estágio 3 (2 a 7 horas), pois, Dellias, 1969, realizava apenas um esfragaço vaginal por dia e, em alguns animais os esfregaços eram feitos em dias alternados. Quanto à duração do metaestro que chamamos estágio 4, acreditamos que a duração de 2 a 5 dias prevista por Dellias, 1969, é bastante excessiva, pois em nossas observações o estágio 4 teve a duração de 9 a 20 horas, o que está de acôrdo com resultados obtidos na cobaia (Stockard e Papanicolaou, 1917, Tribby, 1943, e Young, 1937). Dellias, 1969, não dividiu o diestro em duas partes tal como nós fizemos.

No estágio 1, primeiramente, ocorre mucificação da camada de células superficiais em contacto com o lúmen da vagina, depois, as células subjacentes à camada mucificada se queratinizam. Quadro semelhante foi descrito no início do estro na cobaia (Selle, 1922). Paralelamente a esta diferenciação da zona superficial do epitélio vaginal em camadas mucificada e queratinizada notamos, também, uma intensa proliferação na sua zona germinativa. A proliferação, diferenciação e descamação da população celular do epitélio vaginal da preá durante o estro parece estar relacionada com a grande quantidade de estrogênio presente no organismo, pois, examinado ovários de preás sacrificadas nos estágios 1, 2 e 3, notamos a presença de folículos em crescimento e maturos e corpos lúteos degenerados e não funcionais. A mucificação no epitélio vaginal no estro foi descrita na cobaia (Selle, 1922, e Tribby, 1943) e obtida experimentalmente com doses subqueratinizantes de estrogênio na cobaia e na camundonga (Meyer e Allen, 1933) e na rata (Clarke e Selye, 1942 e Rosa e Alvarado, 1959). Doses superiores àquelas necessárias para mucificação causam mucificação e queratinização do epitélio vaginal da cobaia (Allen e Meyer, 1933, Nicol e Snell, 1954 a, Harmreck e Greenwald, 1966). Recentemente, Harmreck e Greenwald, 1966, sugeriram que a interação estrogênio-progesterona resulta na mucificação vaginal da cobaia e acentuaram a importância da adrenal na produção de hormônios semelhantes à progesterona e ao estrogênio.

A medida que o estágio 1 progride aumenta a espessura da camada queratinizada e as células superficiais mucosas tornam-se picnóticas e descamam intensamente. Talvez, um dos fatôres que faz com que as células superficiais mucosas tornem-se picnóticas e descamem seja a diminuição de nutrição destas células devido a grande espessura do epitélio vaginal. Aliás, em alguns estros não ocorre queratinização em regiões próximas ao opérculo vaginal e nelas podemos encontrar epitélio relativamente delgado com células superficiais mucosas bem conservadas. Êsse ponto de vista coincide com o de Tribby, 1943 e Nicol e Snell, 1954 a, b, para explicação da picnose nuclear e descamação das células superficiais do epitélio vaginal da cobaia. Meyer e Allen, 1933, demonstraram experimentalmente na cobaia que a queratinização das células subjacentes à camada mucificada do epitélio vaginal acarreta a descamação das células superficiais mu-

cosas. Desta maneira, acreditamos que pelo menos parte do muco encontrado no esfregaço vaginal do estro seja proveniente de uma secreção vaginal. Esta conclusão é semelhante a de Selle, 1922, e Tribby, 1943, em relação ao muco presente no esfregaço vaginal do estro na cobaia. Talvez, a secreção vaginal da preá no estro constitua um tipo de secreção holócrina tal como Lelièvre e Retterer, 1910, descreveram na cobaia à têrmo.

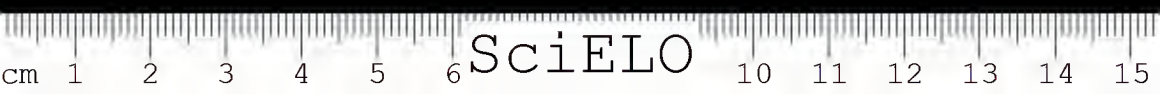
A coloração indicativa de Alcian-Blue, permitiu-nos comprovar o caráter mucoso das células da camada mais externa da zona superficial do epitélio vaginal no estágio 1, e também afastar a hipótese de que as células superficiais picnóticas encontradas no esfregaço vaginal do fim do estágio 1 sejam exclusivamente células em vias de queratinização ou tipos de células queratinizadas como alguns autôres descreveram na cobaia (Stockard e Papanicolaou, 1917 e 1919, Selle, 1922 e Papanicolaou, 193 b.).

O fim do estro ou estágio é marcado por intensa leucocitose em tôda a parede da vagina. A invasão leucocitária inicia-se no fim do estágio 3, mas sòmente no estágio 4 que os leucócitos alcançam o lúmen vaginal e ela deve ser um fenômeno secundário tal como na cobaia (Stockard e Papanicolaou, 1917). Os leucócitos exercem sua ação tanto nas células descamadas no lúmen como nas células que estão na parede da vagina. É comum nos esfregaços vaginais do estágio 4 têrmos células basais com leucócitos dentro. As projeções do epitélio vaginal do estroma podem não sofrer ação leucocitária, talvez, isto esteja relacionado com a restauração do epitélio vaginal pós-estro.

Em contraste com o estro, o epitélio vaginal diestral apresenta-se delgado e não podemos dividí-lo em zonas. Um ou dois dias após o estro, êle está recuperado das injúrias sofridas devido à leucocitose do estágio 4. No diestro 1 é pequena a quantidade de leucócitos no estroma e epitélio vaginais. Em certas regiões da vagina e principalmente na região próxima ao opérculo vaginal encontra-se mucificado. O aspecto das células superficiais diestrais que contém muco é semelhante ao das células mucosas do estro. Nesta época, examinando os ovários verificamos a presença de corpos lúteos grandes e funcionais (geralmente um por ovário) e folículos pouco desenvolvidos. Possìvelmente, existe relação entre a secreção do corpo lúteo e a mucificação parcial do epitélio vaginal diestral da preá. Hemreck e Greenwald, 1966, obtiveram mucificação vaginal na cobaia com aplicações de progesterona.

No diestro 2, o epitélio vaginal apresenta-se com sua menor espessura e invadido por leucócitos. As mitoses são comuns tanto nas camadas profundas como nas superficiais.. A fina espessura do epitélio, talvez, deva-se a descamação relativamente intensa de suas células.

Somos levados a relacionar a êsse início da proliferação do epitélio vaginal diestral com o crescimento e amadurecimento dos folículos ovarianos. Por volta de 8 dias após o estro, os ovários apresentam folículos em crescimento e maturos e corpos lúteos funcionais do último estro.

O comportamento da população celular do epitélio vaginal da preá durante o ciclo estral é muito semelhante ao da cobaia e deve estar relacionado com o estado endócrino do indivíduo tal como nêste último.

CONCLUSÕES

A preá nascida em cativeiro apresenta ciclo sexual (duração de 13 a 17 dias) semelhante sôbre quase todos os aspectos ao da cobaia. Baseando-se no aspecto do esfregaço vaginal dividimos o ciclo sexual em 2 partes: estro ou fase de atividade sexual (26 a 56 hs) e diestro ou fase de repouso (10 a 15 dias). No estro (por nós subdividido em 4 estágios) a população celular do epitélio vaginal apresenta intensa proliferação, diferenciação e descamação.

Inicialmente, ocorre mucificação das células epiteliais superficiais e posteriormente, as células subjacentes à camada mucificada se queratinizam (estágio 1 inicial). À medida que o ciclo progride, as células superficiais mucosas tornam-se picnóticas e descamam intensamente (estágio 1 final). Segue-se a descamação das células queratinizadas (estágio 2) e das células epiteliais basais (estágio 3). O final do estro é caracterizado por uma intensa leucocitose em tôda a parede da vagina, que se encontra colapsada (estágio 4).

No diestro, inicialmente, o esfregaço vaginal apresenta poucas células epiteliais diestrais, leucócitos e muco. O epitélio vaginal é delgado e com raras mitoses, podendo ocorrer mucificações das células superficiais tal como no estro (diestro 1). Posteriormente, o esfregaço torna-se rico em células diestrais que descamam em grupo. O epitélio apresenta-se delgado, mas com algumas mitoses (diestro 2).

O epitélio vaginal da preá apresenta comportamento durante o ciclo sexual semelhante ao da cobaia, e tal como nêste último deve estar relacionado com o estado endócrino do organismo.

SUMMARY: The preá (*Cavia aperea* aperea) a wild Brasilian cavoy born in captivity has a estrous cycle (duration 13-17 days) very similar to that of the guinea pig and which we divided into two parts on the basis of vaginal smears: estrus, or the phase of sexual activity (26 to 56 hours) and diestrus, or the resting phase (10-15 days). During estrus (which we subdivided into four stages) the cellular population of the vaginal epithelium is characterized by intense proliferation, differentiation and delamination. Initially, there occurs a mucification of the superficial cells and, later, a keratinization of the cells subjacent to the mucified layer. The superficial mucus cells become pycnotic and delaminate intensely, followed by the delamination or the keratinized cells- The end of estrus is characterized by an intense leucocytosis in the entire vaginal wall. In diestrus, the vaginal epithelium is thin and cannot be divided into zones as it can in estrus.

We discussed the results obtained, taking into consideration the endocrine state of the individual, principally from the point of view of the ovaries.

UNITERMS: Cavia aperea aperea Hormonal Colpocitology.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Newton Macha, do Departamento de Histologia da U.S.P.; ao Dr. Earl Albert Hart da Seção de Anatomia Patológica do Inst. Butantan, queremos agradecer a colaboração emprestada. Também desejamos agradecer ao Sr. Elyseu Baptista de Oliveira cuja dedicação ao biotério nos propiciou a boa execução da presente pesquisa.

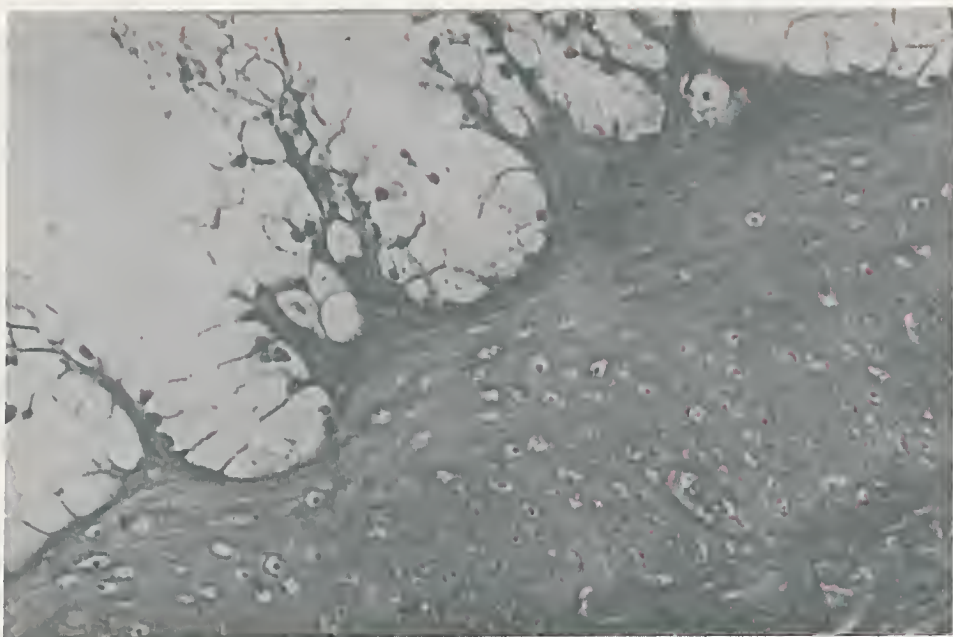



Fig. 1 — Secção longitudinal da parede da vagina próxima ao opérculo vaginal. Aspecto do estágio 1 inicial do estro. Notar o epitélio vaginal espessado e o aspecto glanduliforme apresentado pelas células superficiais mucosas. Em outras regiões da vagina dêste mesmo animal a camada queratinizada já está formada. (Mallory, ± 160 vêzes).

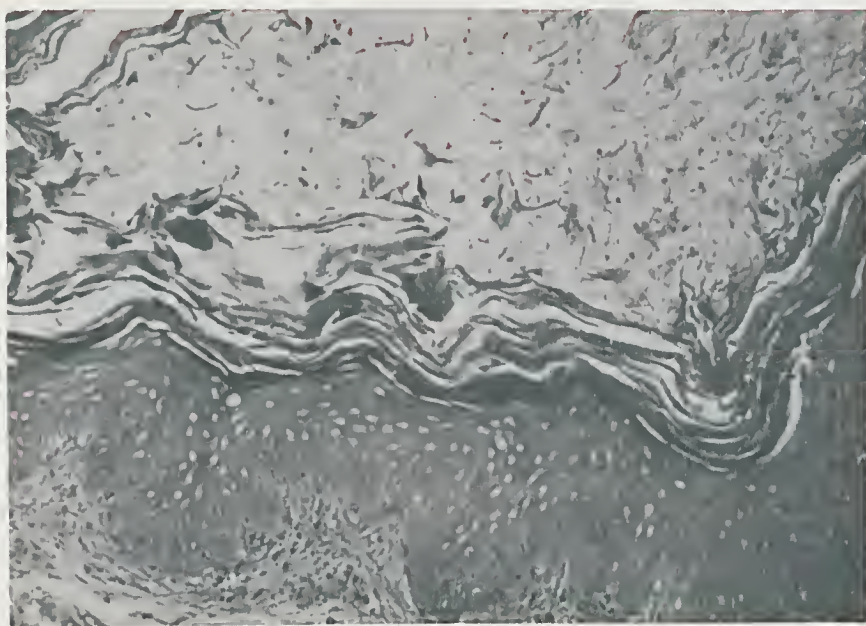



Fig. 2 — Secção transversal da parede da vagina próxima ao cérvice. Aspecto do fim do estágio 1 do estro. Notar as células superficiais mucosas picnóticas em vias de descamação. Podemos observar as zonas germinativas, basal e germinativa do epitélio vaginal. (Mallory ± 160 vêzes).

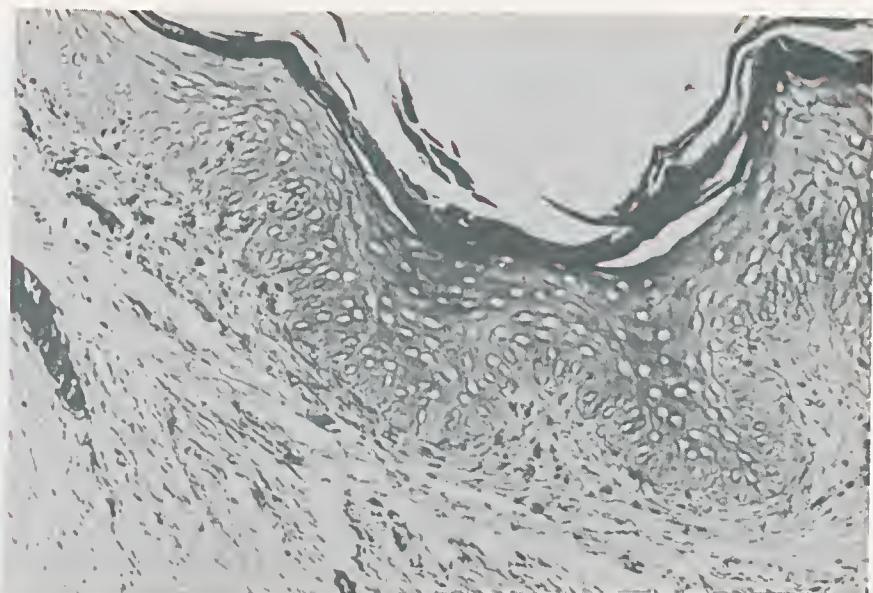



Fig. 3 — Secção transversal da parede da vagina próxima ao cérvice. Aspecto do estágio 2 do estro. Agora é a camada queratinizada que está em contacto com o lúmen vaginal. (Mallory, ± 160 vêzes).

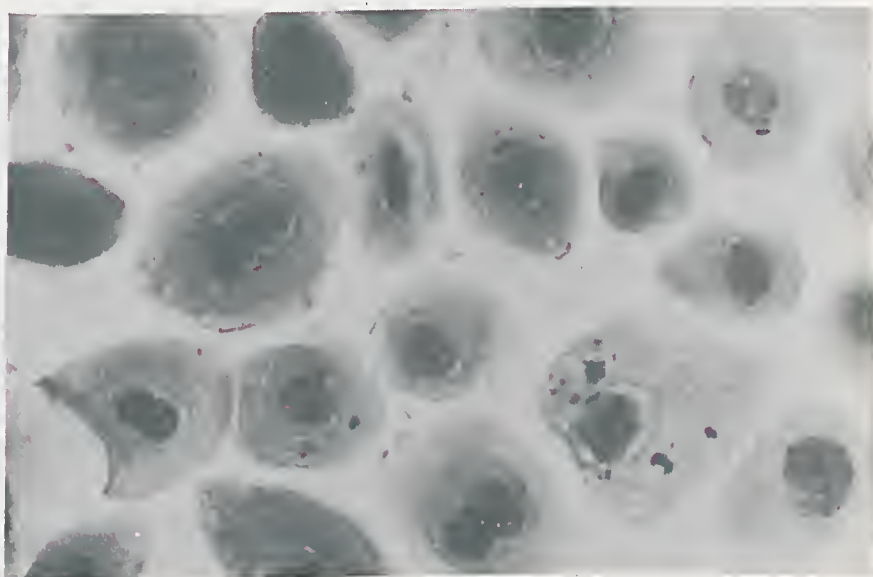



Fig. 4 — Esfregaço vaginal do estágio 3 do estro. A maioria das células epiteliais basais presentes apresentam vacúolos perinucleares que indicam picnose nuclear. As células basais coram-se intensamente pelo Método de Harris-Shorr. (Shorr, ± 500 vêzes).

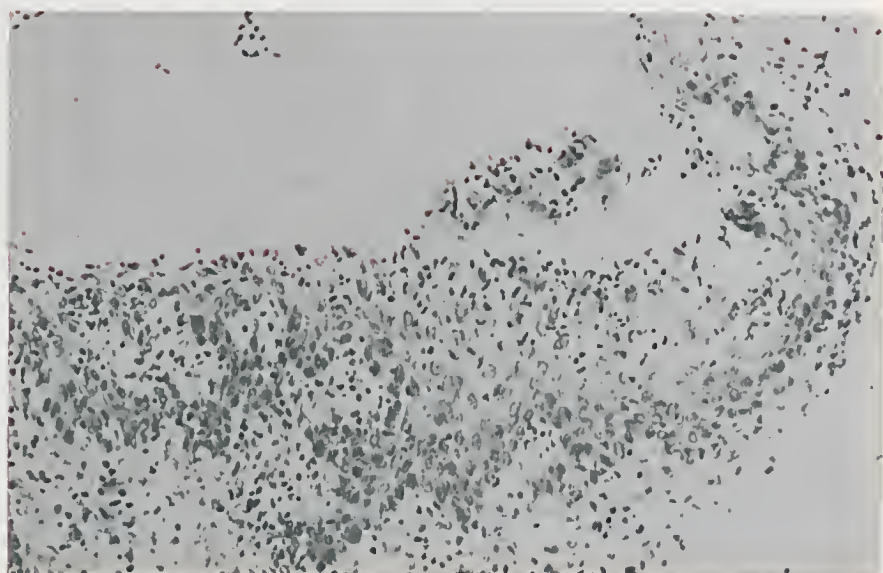



Fig. 5 — Corte transversal da parede da vagina próxima ao cérvice. Aspecto do estágio 4 do estro. O epitélio e estroma vaginais encontram-se intensamente invadidos por leucócitos. O epitélio vaginal é formado pelas zonas germinativa e basal, sendo que esta última apresenta-se vacuolizada em muitos pontos, devido à ação leucicitária. (HE ± 130 vêzes).

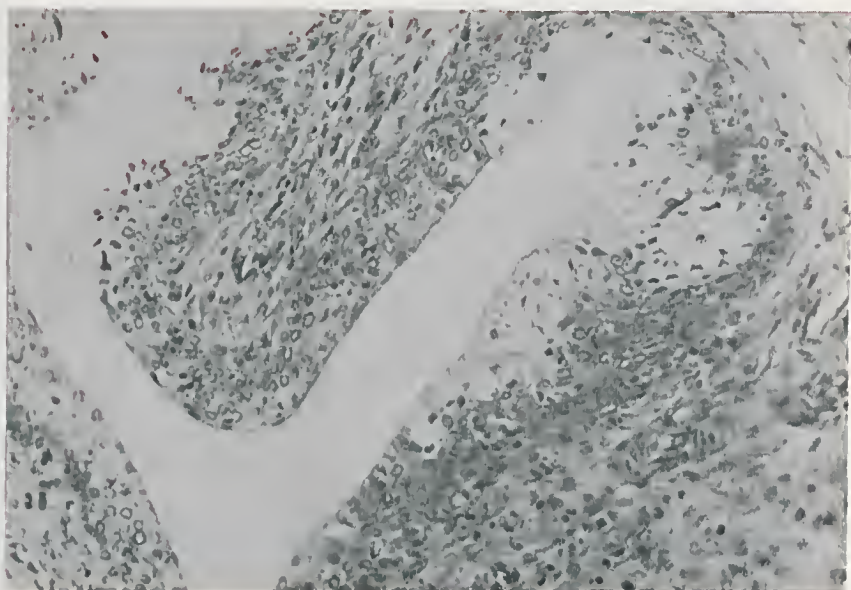



Fig. 6 — Corte transversal da parede da vagina próximo ao cérvice. Aspecto do diestro 1 (2 dias após o estro). Comparar a espessura e o aspecto dêste epitélio vaginal com os dos estágios do estro. Notar a mucificação em certos trechos e a presença de alguns leucócitos no epitélio vaginal (HE ± 130 vêzes).

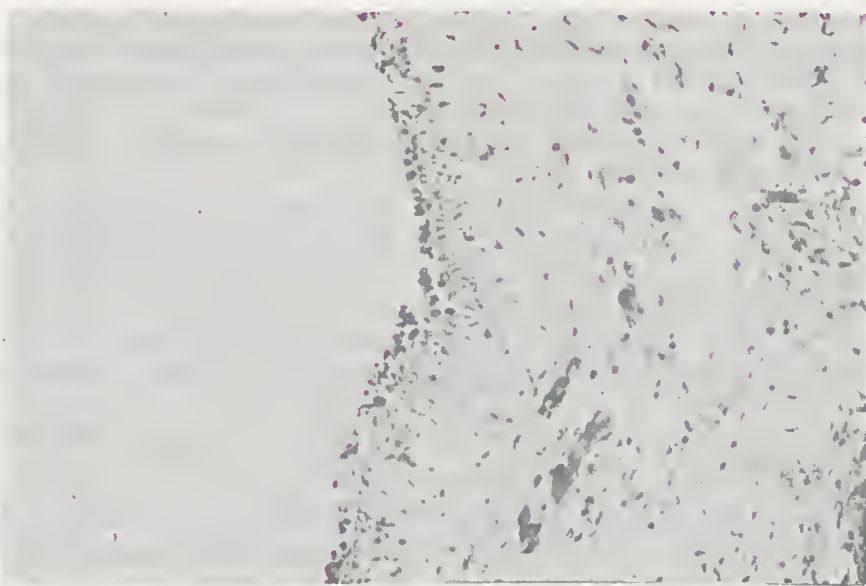



Fig. 7 — Corte transversal da vagina próximo ao cérvice. Aspecto do diestro 2 (8 dias após o estro). Epitélio vaginal extremamente delgado e a presença de leucócitos nas suas células superficiais. (HE, ± 130 vêzes).

F. SILVEIRA F.º, J. e MACHADO, J.C. — Alterações do epitélio e esfregaços vaginais da preá (Cavia aperea aperea) durante o ciclo estral e estudo comparativo com as da cobaia. *Mem. Inst. Butantan*, 35: 63-78, 1971.

BIBLIOGRAFIA

1) BACSICH, P., and WYBURN, G. M. — *Proc. roy. Edinb.*, **60**:33, 1939.

2) BUELLER-SOUTO, A. et v. UBISH, G. — *Revue d'Immunologie*, **5**(1):54, 1939.

3) CASTRO, A. F. P., SANTA ROSA, C. A. e TROISE, C. — *Arq. Inst. Biol.* **28**(23):219, 1961.

4) CLARKE, E., and SELYE, H. — *Am. J. Med. Sciences*, **204**:301, 1943.

5) DELLIAS, P. — "Contribuição para o estudo da biologia da preá (Cavia aperea aperea) seu aproveitamento em Fisiologia Experimental e estudo do ciclo estral". Tese Fac. de Farm. e Odont. de S. José dos Campos, 1969.

6) HERMRECK, A. S., and GREENWALD, G. S. — *Am. J. Anat.*, **118**:861, 1966.

7) KELLY, G. L., and PAPANICOLAOU, G. — *Am. J. Anat.* **40**:387, 1927.

8) LELIÈVRE, A., et RETTERER, E. — *Compete Rend. Soc. de Biol.*, **68**:596, 1910.

9) LIPCHUTZ, A. — *Biochem. Zeit.*, **215**:222.

10) LISON, L. — "Histochimie et cytochimie animales", vol. II, 3.ª ed., Gauthier--Villars, Paris, 1960.

11) LONG, J. A., and EVANS, H. — *Mem. Univ. Calif.*, **6**(2):148, 1922.

12) MELLO, R. F., e FRANKE, C. — *Rev. Bras. de Biol.*, **5**(2):231, 1945.

13) MEYER, R., and ALLEN, W. — *Anat. Rec.*, **56**(4):321, 1933.

14) MIRANDA, R. N., SÃO MARCOS, A. TARLÉ, S. F., CORES, D. W., e D'ALMEIDA, A. — Public. Centro Estudos Leprológicos, 7(2):8, 1967, Curitiba.

15) NICOL, T., and SNELL, R. S. — *Journ. of Obst. and Gynaec. of Brit. Emp.*, **61**:86, 1954a.

16) ———————— — *Journ. of Obst. and Gynaec. of Emp.* **61**:216, 1954 b.

17) PAPANICOLAOU, G. — *Anat. Rec.*, **55**:71, 1933 a.

18) ———————— — *Am. J. Anat.*, **52**:519, 1933 b.

19) PUNDEL, J. P. — "Précis de Colpocytologie Hormonale". Masson, Paris, 1966.

20) ROSA, C. G., and VELARDO, J. T. — *Ann. N. York. Acad. Sciences*, **83**:122, 1959.

21) SELLE, C. R. — *Am. J. Anat.*, **30**:429, 1922.

22) STOCKARD, C. R. — "Fluid of Mammalian vagina": pgna. 1610; in Special Cytology, vol. 3, Editor E. V. Cowdry, Paul B. Howeber, New York, 1930.

23) STOCKARD, C. D., and PAPANICOLAOU, G. — *Am. J. Anat.*, **22**:225, 1917.

24) ———————— — *Biol. Bull.*, **37**:222, 1919.

25) von UBISCH, G., e AMARAL, J. P. — *Mem. Inst. Butantan*, XX, 17:9, 1935-36.

26) von UBISCH, G., e MELLO, R. F. — *Journ. of Heredity*, **31**(9):389, 1940.

27) YOUNG, W. — *Anat. Rec.*, **67**(3):305, 1937.

Recebido para publicação em 10 de novembro de 1971.

Mem. Inst. Butantan
35: 79-94, 1971.

PRODUÇÃO DE LESÕES SEMELHANTES ÀS DO PÊNFIGO FOLIÁCEO PELA INJEÇÃO INTRADÉRMICA, EM COELHOS E MACACOS, DE SÔROS DE DOENTES COM TÍTULO ELEVADO DE AUTOANTICORPO

ERNST BEUTNER *, GARY W. WOOD *, TADEUSZ P. CHORZELSKI **,
CID DE ABREU LEME *** e OTTO G. BIER ****

RESUMO — Microbôlhas intraepidérmicas acantolíticas histològicamente semelhantes às encontradas no pênfigo humano puderam ser induzidas experimentalmente em coelhos e macacos, mediante a injeção intradérmica de sôros de casos de Pênfigo Foliáceo Brasileiro (PFB) com teor elevado de anticorpo intercelular.

Nas experiências em coelhos, resultados positivos foram obtidos sòmente com um sôro selecionado (Sôro N.° 1) e tratando-se o sítio inoculado com solução a 1-2% de dinitroclorobenzeno. Três outros sôros experimentados, embora possuidores de alto título de anticorpo intercelular, exibiram menor capacidade de fixação à pele do coelho e foram incapazes de produzir lesões acantolíticas. Comportamento semelhante mostrou o Sôro n.° 1 após "envelhecimento" no laboratório a —20.°.

Em macacos, lesões semelhantes às do pênfigo humano foram obtidas após 2 ou 3 injeções intradérmicas de sôros de PFB com alto teor de anticorpo intercelular na mesma área cutânea, mas não com uma única injeção.

UNITÊRMOS — *Pemphigus Foliaceus* ("Fogo Selvagem"); Transferência passiva de lesões penfigóides; Autoimunidade no Pênfigo Foliáceo.

INTRODUÇÃO

Em 1964, Beutner & Jordan (1) verificaram que no sôro de doentes de *Pemphigus vulgaris* (PV) existiam autoanticorpos reveláveis por imunofluorescência indireta, utilizando como substrato o epitélio escamoso estratificado do esôfago de macaco ou humano. O anticorpo em questão mostrou ser notàvelmente específico para o pênfigo e localizava-se electivamente nas áreas intercelulares, sobretudo ao nível do *stratum spinosum*.

* Departamento de Microbiologia, Escola de Medicina, SUNY em Buffalo, Buffalo, New York, E. Unidos.
** Departamento de Dermatologia, Escola de Medicina, Varsóvia, Polônia.
*** Hospital Ademar de Barros, São Paulo, Brasil.
**** Centro OMS/OPS de Pesquisa e Formação em Imunologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

Estas observações foram confirmadas e ampliadas em 1968 quando se demonstrou que, em pràticamente 100% dos casos de *Pemphigus Foliaceus* ("Fogo selvagem"), encontravam-se anticorpos fluorescentes intercelulares em título mais elevado que no PV, podendo, em certos casos, atingir a 1:2560 ou acima (2).

Embora os dados epidemiológicos indiquem que o Pênfigo Foliáceo Brasileiro (PFB) tenha etiologia viral e esteja associado à transmissão por artrópodes (3), a correlação observada entre o teor de autoanticorpo circulante e a gravidade da doença levou a sugerir que em sua patogenia estivesse envolvido um mecanismo autoimune. As evidências em favor dêste conceito são múltiplas e foram sumariadas em (4):

1.º) Presença constante do autoanticorpo nos casos com lesões ativas.

2.º) Relação entre os títulos de anticorpo e a gravidade da doença.

3.º) Fixação *in vivo* do anticorpo e de complemento (3) ao nível das lesões cutâneas.

4.º) Correspondência entre a localização do antígeno reativo e a sede das lesões.

5.º) Fixação intercelular do anticorpo em macacos injetados pela via intradérmica com sôro de pacientes.

6.º) Aparecimento do anticorpo intercelular antes do desenvolvimento das bôlhas típicas intraepiteliais.

No que pese a fôrça de sugestão dêstes argumentos, prova crucial da patogenicidade do autoanticorpo requer a produção das bôlhas acantolíticas que caracterizam a etiologia da doença.

As tentativas feitas neste sentido com sôros de casos de PV foram negativas pois evidenciaram apenas a fixação do anticorpo à pele de macacos, coelhos e cobaias, mas não o desenvolvimento das lesões características (5, 6, 7).

Grob & Inderbitzen (8) e Shu & Beutner (9) induziram a formação de autoanticorpos anti-pele em coelhos, porém experiências de bloqueio da imunofluorescência mostraram que tais anticorpos diferiam dos encontrados no PV ou no PFB (9). Inderbitzen & Grob (10) referiram haver observado o desenvolvimento de lesões acantolíticas nos coelhos com alto teor de autoanticorpo, porém o método empregado por êstes autores incluía a cauterização da pele com gêlo sêco, o que, por si só, é já capaz de provocar o aparecimento das referidas lesões.

Mais recentemente, Chorzelski et al. (11) comunicaram haver obtido o desenvolvimento de lesões acantolíticas mediante a injeção intracutânea em coelhos de sôros de pênfigo diluídos em sôro de fase aguda (pneumonia, tuberculose), seguida de tratamento local com 2,4 dinitroclorobenzeno (DNCB). Resultados idênticos foram posteriormente referidos com sôros selecionados de casos de PFB (12).

No presente trabalho, as experiências de transferência passiva em coelhos foram ampliadas a fim de melhor definir o papel do sôro de fase aguda usado nas

experiências anteriores. Além disso, são também apresentados os resultados de inoculações intracutâneas em macacos, nas quais se eliminou o tratamento local com DNCB.

MATERIAL E MÉTODOS

Sôros — Sôros de PFB foram obtidos de casos agudos, esterilizados por filtração e mantidos, congelados ou liofilizados, a – 20º. Todos os sôros foram prèviamente titulados em relação ao teor de anticorpo intercelular, de acôrdo com o método descrito em (2).

Como contrôles, utilizaram-se sôros de pacientes com doenças autoimunes (lupus eritematoso sistêmico, *myasthenia gravis,* tireoidite), penfigóide bolhoso, pneumonia, tuberculose, bem como sôros de indivíduos aparentemente normais.

Transferência passiva — Nas experiências em coelhos, os animais receberam 0.05 a 0.2 ml de sôro não diluído ou diluído a 1:2 na pele prèviamente raspada do abdomen ou do dorso. Imediatamente após a injeção intradérmica, os sítios injetados foram tratados com soluções de DNCB em concentrações variáveis de 0.1 a 5%. Na maioria das vêzes utilizaram-se soluções a 1 a 2%. Numa série de experiências, ao invés do tratamento dos sítios injetados com DNCB, procedeu à cauterização local com gêlo sêco durante 10 a 30 segundos.

O emprêgo dêstes irritantes teve como objetivo aumentar a permeabilidade da barreira dermo-epidérmica. Sítios não injetados foram também irritados com DNCB, a fim de servirem como contrôles.

Nas experiências em macacos (rhesus), 0.2 ml de sôro não diluído foram injetados intradèrmicamente, uma, duas ou três vezes na mesma área cutânea, a intervalos de 3-4 horas.

Biópsias — Fragmentos de pele de áreas injetadas ou distantes foram retirados por biópsia 24-48 horas após a injeção intracutânea em coelhos. Nos macacos, o intervalo das biópsias variou nos animais que receberam 1, 2 ou 3 injeções: a) no caso de uma única injeção, as biópsias foram feitas após 3, 7 e 24 horas; b) no caso de duas ou três injeções, 3-4 horas após a segunda e 17 após a terceira.

Os resultados das biópsias foram avaliados após leituras "cegas", por dois ou três investigadores, de espécimes codificados.

Colorações — Os fragmentos obtidos por biópsia foram fixados com formol e corados pela hematoxilina-eosina, de acôrdo com a técnica histológica rotineira, ou congelados e cortados em criostato para a técnica de imunofluorescência. O conjugado anti-IgG humana utilizado foi prèviamente verificado com relação à sua sensibilidade, mediante determinações de proteína (P), anticorpo (Ac) e fluoresceína (F), de acôrdo com métodos anteriormente descritos (13) e tal como exemplificado na tabela 1. A concentração de anticorpo (em proteína) foi ajustada a 20-60 mcg/ml.

TABELA 1

Características do conjugado anti-IgG humano (anti-kappa e anti-lambda) usado para a coloração imunofluorescente dos fragmentos de pele obtidos por biópsia

N.º do conjugado	Anticorpo(Ac) mg/ml	Fluores-ceina(F) mcg/ml	Proteina(P) mcg/ml	Ac/F	F/P
310	3.4	108	10.6	31.5	10.2

RESULTADOS

Experiências em coelhos

Antes de proceder às tentativas de transferência passiva em coelhos, experiências prévias foram feitas para determinar: a) qual a concentração de DNCB que poderia ser utilizada sem produzir dano epitelial em sítios não injetados; b) que doses de sôro deveriam ser empregadas para produzir um grau de fixação *in vivo* detectável pela metodologia utilizada.

Com relação ao primeiro item, verificou-se dano epitelial não específico com DNCB a 5% em sítios não injetados e, por vezes, com a concentração de 2% nos locais injetados com sôros contrôles. Por esta razão, a concentração de 1% foi preferida na maioria das experiências.

No que concerne ao item b), resultados avaliados em 3 +, 2 + e + ou ± foram obtidos, respectivamente, com 0.1, 0.05 e 0.025 ml de sôros PFB com alto teor de anticorpo intercelular.

Experiências com um sôro selecionado de PFB

Uma primeira série de experiências foi realizada em abril-maio de 1968 com o sôro PFB n.º 1, com elevado teor de anticorpo intercelular. 0.1 ml de sôro 1 mais 0.1 ml de sôro de fase aguda (pneumonia) foram injetados intradèrmicamente em 16 coelhos, seguindo-se tratamento local com DNCB a 2%.

A experiência revelou fixação do anticorpo *in vivo* em todos os animais inoculados e formação de microbôlhas intraepidérmicas com células acantolíticas semelhantes às encontradas no pênfigo humano em 6 dêles (tab. 2 e figs. 1-4).

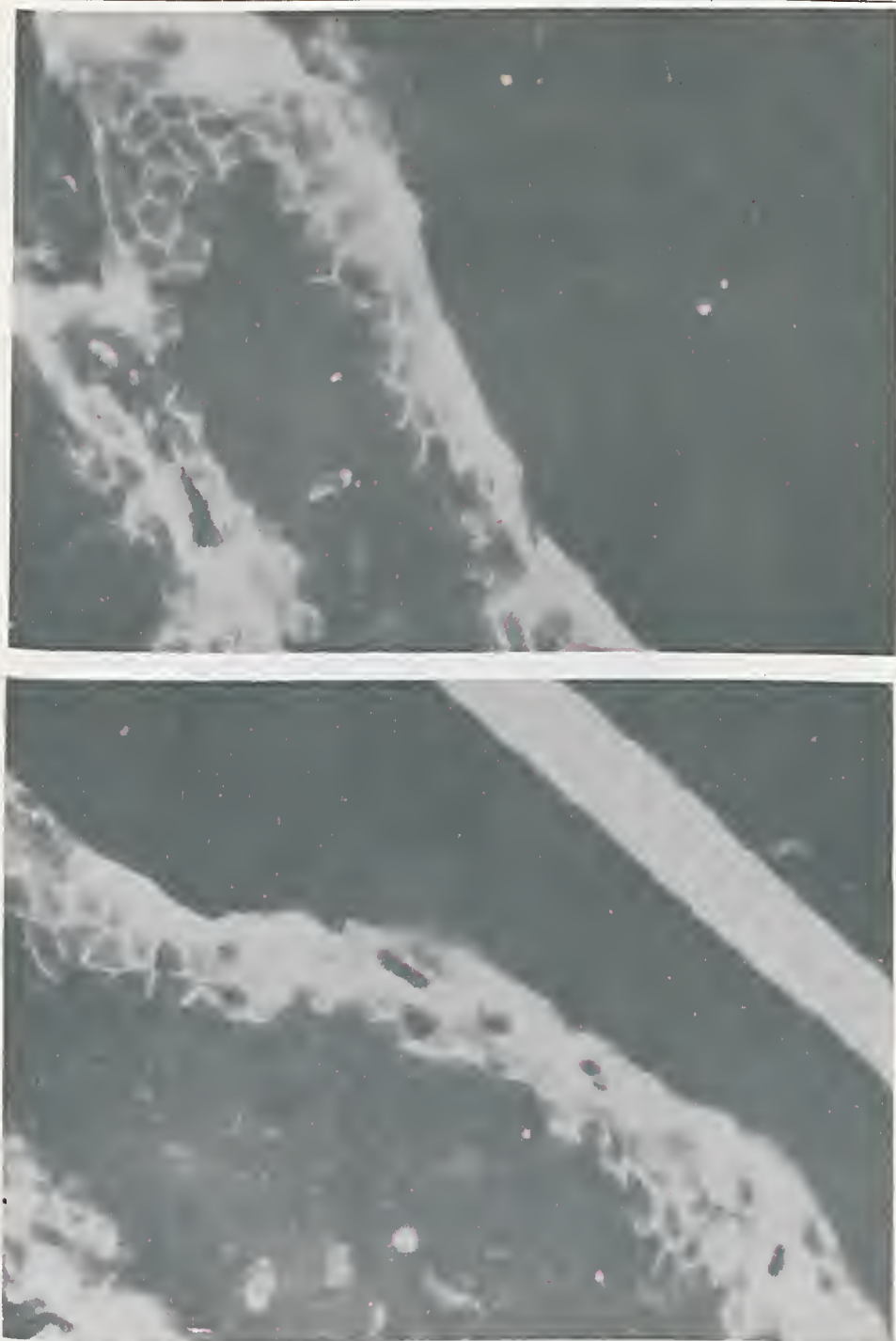



Fig. 1 e 2 — Imunofluorescência (IF) de pele de coelho injetada com 0.2 ml de uma diluição a 1:2 de sôro de PFB em sôro de fase aguda. Tratamento do sítio injetado com DNCB a 2%. Nota-se não só a fixação do anticorpo intercelular, como também o aparecimento de lesões características intra-epidérmicas. X 600.

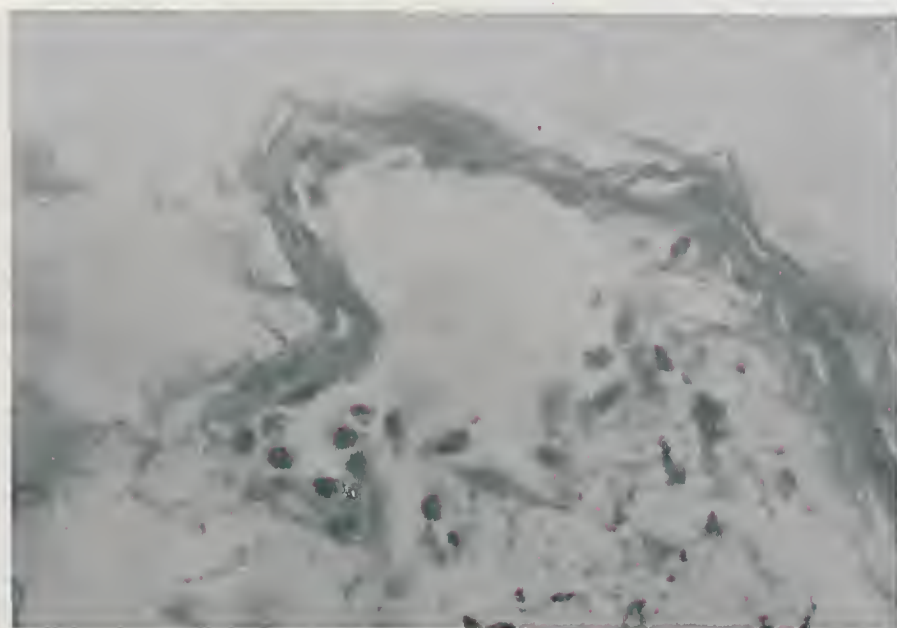
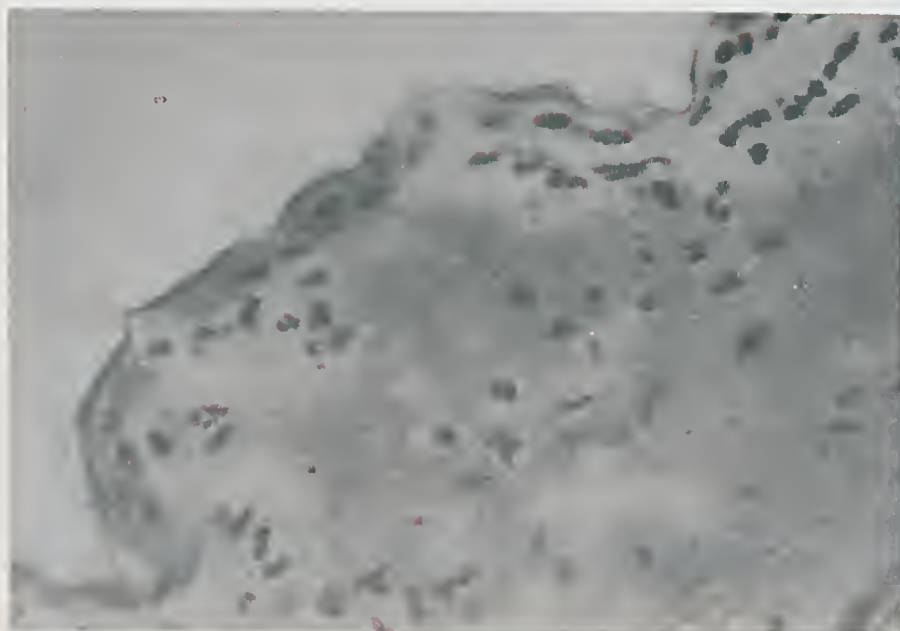



Fig. 3 — Corte ao criostato de pele de coelho injetada com 0.1 ml de sôro de caso agudo de pneumonia e tratada com DNCB a 20%. Coloração pela hematoxilina-eosina. Derme à direita e em baixo. Aspecto histológico normal. X 600.

Fig. 4 — Corte ao criostato de pele de coelho tratada como nas figuras 1 e 2. Coloração pela hematoxilina-eosina. Microbôlha intraepitelial. X 600.

Experiências realizadas, na mesma oportunidade, com o sôro de fase aguda aquecido a 56º 30 minutos, deram resultado semelhante.

A experiência acima foi repetida em janeiro-fevereiro de 1969 e revelou enfraquecimento da atividade do sôro, que só foi capaz de mostrar fixação *in vivo* em 12 de 14 coelhos inoculados e não mais determinou a formação de microbôlhas típicas (figs. 5 a 7).

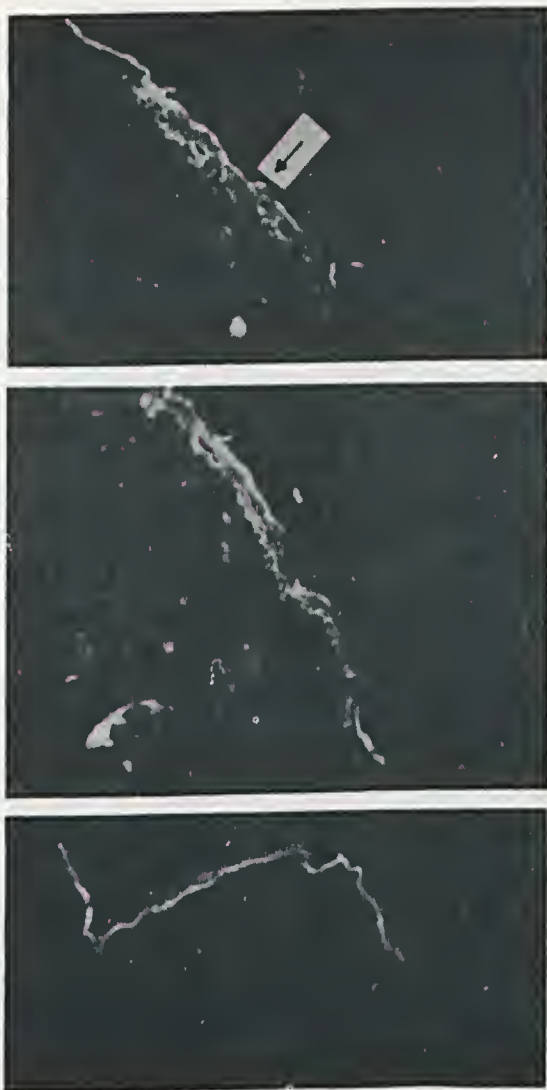



Fig. 5 — Coloração de pele de coelho injetada com sôro de PRB rico em autoanticorpo. Notar a forte coloração IF da substância intercelular e a formação de uma pequena bôlha intraepidérmica no local indicado pela seta. X 250.

Fig. 6 — Idem. Bôlha sub-epidérmica inespecífica. X 250.

Fig. 7 — Coloração IF de pele de coelho injetada com sôro normal. A forte fluorescência à superfície da pele resulta da ação de um autoanticorpo contra o *stratum corneum*, existente em sôros normais. X 250.

Numa segunda replicação da prova em março-abril de 1971, o fenômeno se acentuou e houve fixação *in vivo* sòmente em 3 de 12 animais inoculados, sendo que em nenhum deles se observou a formação de microbôlhas.

É interessante notar que esta modificação da reatividade do sôro não se acompanhou de qualquer alteração do título de anticorpo intercelular, que se manteve constante. A tabela 2 resume os resultados destas experiências num total de 42 coelhos, durante o período de um ano.

TABELA 2

Experiências de transferência passiva com um sôro selecionado de PFB (Sôro 1) em coelhos injetados pela via intradérmica.

Data da experiência	Reações observadas à transferência passiva				
	Número de Coelhos	Fixação *in vivo*	Lesões intraepidérmicas *		
			Positivas	Duvidosas	Negativas
Abril-maio/68	16	16/16	5	0	11
Jan.-fev./69	14	12/14	0	5	9
Março-abril/69	12	3/12	0	0	12

* As reações positivas correspondem a microbôlhas intra-epidérmicas com células acantolíticas e as negativas a lesões semelhantes, porém não acompanhadas de acantólise.

Embora as lesões intradérmicas observadas no período de janeiro a fevereiro de 1969 não se assemelham histològicamente às bôlhas do pênfigo humano, elas parecem ser imunològicamente específicas, pois não se desenvolveram em grupos de contrôle inoculados com sôros não específicos. É pertinente ainda mencionar que sôros de casos de PFB que mostraram anticorpos intercelulares quando se usou como substrato esôfago de primata, mas não com esôfago de coelho, também foram incapazes de fixar-se *in vivo* ou de produzir microbôlhas à inoculação intradérmica no coelho.

Experiências com três outros sôros de PFB

Em face do comportamento peculiar do sôro PFB n.º 1, experiências adicionais foram feitas com três outros sôros (N.ºs 2, 3 e 4) que apresentavam títulos de anticorpo intercelular comparáveis ao do sôro n.º 1.

Estas experiências estão resumidas na tabela 3, na qual se evidencia que a proporção de sítios imunofluorescentes (fixação *in vivo*) foi de 53/59 para o sôro 1 e de 22/38 para os sôros 2, 3 e 4. Quanto à formação de microbôlhas, foi sempre do tipo não acantolítico e ocorreu na proporção de 53/99 com o sôro 1 e de 22/38 com os sôros 2, 3 e 4. Em 72 contrôles jamais se observou, seja fixação *in vivo*, seja formação de bôlhas intraepidérmicas.

TABELA 3

Fixação in vivo *e desenvolvimento de lesões intraepidérmicas em coelhos injetados com 4 diferentes sôros de PFB e 20 sôros de não penfigosos.*

Sôros injetados	Título de anticorpo intercelular	N.° de sítios injetados	Proporção de sítios imunofluorescentes	Proporção de sítios com lesões intraepidérmicas
PFB N.° 1	1280	99	53/99	5/53
PFB Ns.° 2-4	640 a 2560	38	22/38	8/22
Contrôles *	0	72	0/72	0

* Os contrôles incluem biópsias de sítios injetados com 1 de 20 sôros não penfigosos mais 14 sítios não injetados e tratados com DNCB.

Os resultados precedentes levaram a reexaminar o papel do sôro de fase guda (tuberculose, pneumonia aguda) com relação à fixação *in vivo* e à produção de lesões pelo sôro PFB.

Em experiências nas quais o sôro 1 foi diluído em sôro de fase aguda ou m salina, a proporção de sítios imunofluorescentes foi de 32/57 (cêrca de 56%) o primeiro caso e de 16/26 (cêrca de 61%) no segundo. Não parece, portanto, ue a adição de sôro de fase aguda desempenhe qualquer papel na fixação *in vivo* o anticorpo intercelular.

No que concerne ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais, puderam também ser obtidas na ausência do sôro de fase aguda.

Experiências em macacos

Sete sôros de PFB foram injetados em *rhesus* por via intradérmica e a intensidade de fixação *in vivo* foi verificada em fragmentos de pele retirados por iópsia ao nível dos sítios de inoculação após intervalos de 3, 7 e 24 horas.

Como indicado na tabela 4, as variações de intensidade da fixação *in vivo* oram paralelas às variações de título de anticorpo intercelular. Por exemplo, os ôros Le e Fe, com títulos inferiores a 1:80 (com pele de macaco) exibiram capacidade de fixação fraca (+) e limitada à camada basal da epiderme, em contraste com o sôro Ci (título de 1:1280), que mostrou forte intensidade de fixação (++++), extensiva a tôda a epiderme. Sôros com títulos entre 1:160 e :320 exibiram comportamento intermediário (fig. 8).

TABELA 4

Relação entre o título de anticorpo IF intercelular e a intensidade de fixação à pele do macaco após uma injeção única de sôro de PFB

Sôro	Título de anticorpo (pele de macaco)	Grau de fixação *in vivo*	Localização da IF
Le	40	+	basal
Fe	80	+	basal
RoA	160	++	basal
Li	160	+++	basal
Tr	320	+++	basal
Ro	320	+++	total
Ci	1280	++++	total

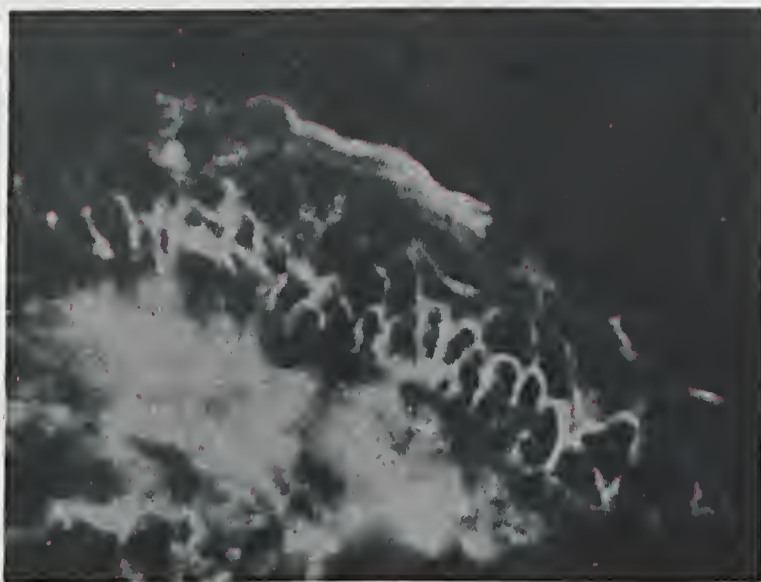



Fig. 8 — Fixação in vivo de anticorpos intercelulares à pele do macaco 3 horas após injeção única de 0.2 ml de sôro de PFB com título médio de autoanticorpo (Sôro AM). X 1000.

Quatro dos sôros precedentes e mais dois outros (SiA, AM), bem como um "pool" de 4 sôros de título mais baixo foram experimentados num esquema de 1, 2 ou 3 injeções, conforme especificado na tabela 5.

TABELA 5

Fixação de anticorpo intercelular IF e desenvolvimento de microbôlhas acantolíticas após 1, 2 ou 3 injeções intradérmicas de sôros de PFB em macacos [1]

Sôro n.°	Título de anticorpo		Uma injeção		Duas injeções		Três injeções	
	Pele	Esôfago	Sítios com Ac fixado	Sítios com lesões típicas	Sítios com Ac fixado	Sítios com lesões típicas	Sítios com Ac fixado	Sítios com lesões típicas
Ci	1280	5120	4/4	1/4	6/8	4/6	4/4	3/4
Ro	320	1280	12/22	0/12	—	—	5/5	4/5
Tr	320	640	11/11	0/11	—	—	4/5	3/4
SiA	320	320	2/3	0/2	4/4	0/4	2/4	1/2
Li	160	2560	1/1	0/1	4/4	0/4	7/7	1/7
Am	160	1280	0/1	0/0	2/4	0/2	3/5	2/3
"Pool" de 5 sôros	40 — 160	160 — 640	3/3	0/3	8/11	0/8	3/5	1/3
		Totais:	33/45	1/33	24/31	4/24	28/35	15/28
Sôros de contrôle[2]	—	—	0/8	0/8	0/11	0/11	0/61	0/61

1 Biópsias 3, 7 e 24 horas após dose única, 3-4 horas após a 2.ª injeção e 17 horas após a 3.ª injeção.

2 45 sôros provenientes de casos de penfigóide bolhôso, lupus eritematoso, tireoidite, myasthemia gravis, pneumonia, tuberculose e de indivíduos normais.

Embora a fixação *in vivo* tenha ocorrido, em qualquer caso, em cêrca de 80%, o desenvolvimento de lesões só teve lugar à repetição das injeções na mesma área cutânea.

É de notar que nos sítios inoculados duas vezes, apenas o sôro Ci, de alto título (1:1280 com pele e 1:5120 com esôfago de macaco) foi capaz de produzir lesão intra-epidérmica (3/4).

Nos animais que receberam 3 injeções, embora tenha havido correlação entre a frequência do aparecimento de lesões características e o título de anticorpo intercelular, houve uma exceção (sôro Li), para a qual não há explicação plausível.

As figuras 9 e 11 ilustram o aspecto das lesões, à imunofluorescência, com duas injeções do sôro Ci (figs. 9 e 10) ou do sôro Ro (fig. 11).

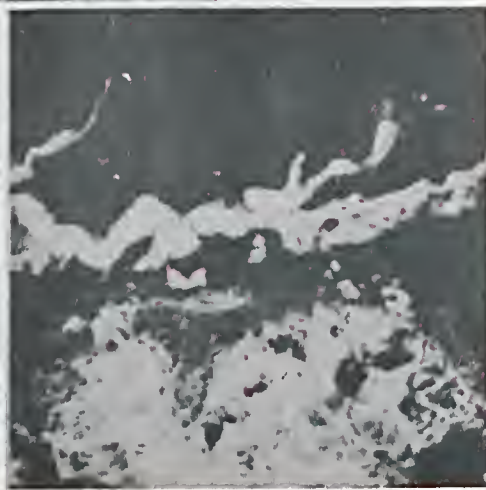
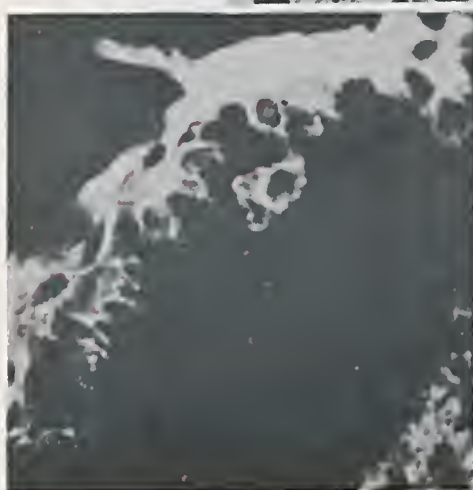
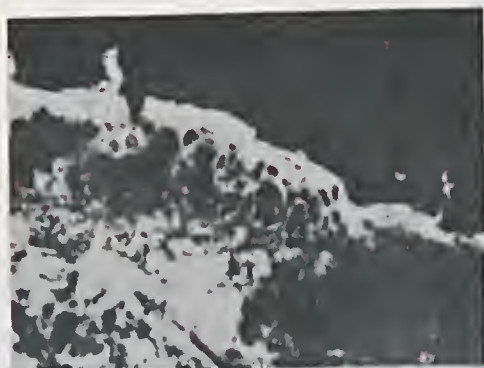



Fig. 9 — Microbôlha intraepidérmica em macaco injetado duas vezes com 0,2 ml de sôro de PFB com título elevado de autoanticorpo (Sôro Ci). Biópsia feita 7 horas após a primeira injeção. IF intercelular no epitélio do teto e na cavidade da bôlha. Quadro imunopatológico semelhante ao observado no PV. X 500.

Fig. 10 — Idem. X 1000

Fig. 11 — Microbôlha intraepidérmica com células epiteliais livres em macaco injetado três vezes com 0,2 ml de sôro de PFB de título médio (Sôro Ro). Biópsia feita 24 horas após a primeira injeção. Notar a coloração IF difusa, que sugere tenham-se eliminado do sítio os anticorpos intercelulares, deixando apenas as lesões por êles causadas. X 500.

As figuras 12 e 13 representam, em coloração por hematoxilina-eosina, o aspecto de lesões verificadas em biópsias de pele 7 horas após a injeção inicial de sôro Ci injetado duas vezes (fig. 12) ou 24 horas após a injeção inicial do sôro Ro injetado três vezes na mesma área cutânea (fig. 13).

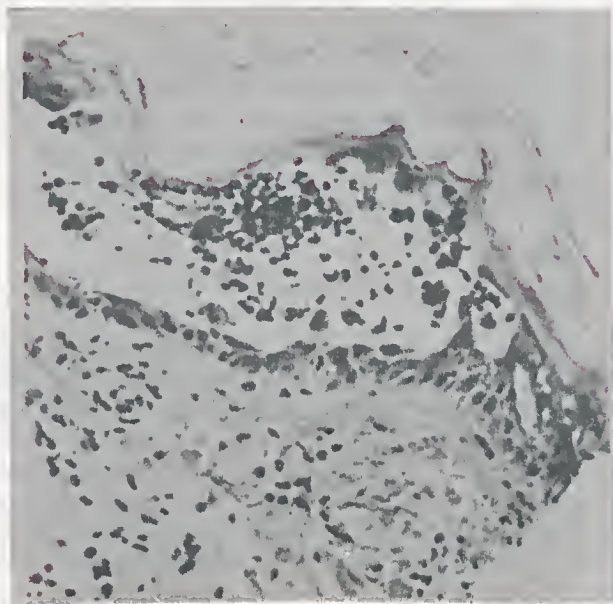



Fig. 12 — Microbôlha intraepidérmica acantolítica sem células inflamatórias consecutiva a 2 injeções intradérmicas de sôro Ci. Biópsia feita 7 horas após a primeira injeção. Coloração por hematoxilina-eosina. X 1000.

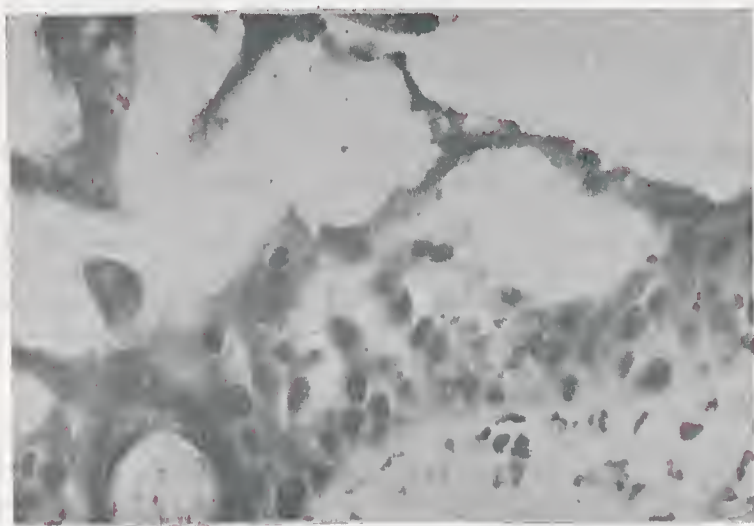



Fig. 13 — Microbôlha intradérmica com algumas células acantolíticas e numerosos leucócitos em macaco injetado 3 vêzes com 0,2 ml de sôro Ro. Biópsia feita 24 horas após a injeção inicial. Coloração por hematoxilina-eosina. X 1000.

Nas lesões provocadas por 3 injeções e retiradas por biópsia após 24 horas, a coloração intercelular à imunofluorescência foi muito mais fraca e de caráter difuso (fig. 11).

Na figura 12 a lesão não se acompanhou de reação inflamatória, ao contrário do que se verifica na figura 13.

Nenhuma fixação de IgG ou desenvolvimento de lesão se observou em 61 sítios contrôles injetados três vezes com 1 de 45 sôros não penfigosos Bôlhas sub-epidérmicas foram ocasionalmente observadas nos animais inoculados 2 ou 3 vezes e com igual frequência nos sítios injetados com sôros PFB ou com sôros não específicados. Tais reações foram classificadas como negativas, pois em nada se assemelham às lesões características do pênfigo.

DISCUSSÃO

A indução experimental de microbôlhas intraepidérmicas acantolíticas històlògicamente semelhantes às observadas no pênfigo humano foi conseguida, numa primeira série de experiências em coelhos, mediante a injeção intracutânea de um sôro selecionado de PFB (Sôro n.º 1) diluído em sôro de fase aguda e tratamento local do sítio injetado com DNCB. A conservação dêste sôro no laboratório, em estado congelado, a − 20º, foi, porém, acompanhada de uma redução progressiva de sua capacidade de fixar-se *in vivo* à pele do coelho e de produzir as lesões características, embora se tenha mantido constante o seu teor de anticorpos intercelulares reveláveis por IF.

Bôlhas intraepidérmicas não acantolíticas puderam, entretanto, ser produzidas com o sôro N.º 1 "envelhecido", bem como com três outros sôros de PFB ricos em anticorpo intercelular. Tais microbôlhas diferem das observadas no pênfigo humano, porém são imunològicamente específicas, pois não foram observadas à injeção de sôros não penfigosos ou de um sôro de PFB positivo em título elevado quando ensaiado à imunofluorescência com esôfago de primata, mas não com esôfago de coelho.

Nas experiências em macacos foi eliminado o tratamento adjuvante destinado a aumentar a permeabilidade dermo-epidérmica (diluição em sôro de fase aguda e aplicação local de DNCB). Substituiu-se, ao invés, a injeção única de sôro por duas ou três injeções repetidas, na mesma área cutânea, com o objetivo de expôr a epiderme, durante um período de tempo prolongado, a uma concentração elevada do anticorpo anti-pênfigo. Isto é, de alguma maneira, o que ocorre nos doentes, nos quais se verifica paralelismo entre o teor de autoanticorpo circulante e a gravidade das lesões cutâneas.

Dentro desta ordem de idéias, caso os anticorpos autoimunes do sôro de PFB estivessem envolvidos no desenvolvimento da lesão acantolítica, era de esperar que lesões semelhantes às do pênfigo humano pudessem ser provocadas pela injeção repetida de antisôros ricos em anticorpo intercelular. Tal previsão foi confirmada pelas experiências relatadas neste trabalho, em condições nas quais foram inteiramente negativos os resultados obtidos com sôros de contrôle não penfigosos.

BEUTNER, E., WOOD, G. W., CHORZELSKI, T. P., ABREU LEME, C. e BIER, O. G. — Produção de lesões semelhantes às do Pênfigo Foliáceo pela injeção intradérmica, em coelhos e macacos, de sôros de doentes com título elevado de autoanticorpo. *Mem. Inst. Butantan,* 35: 79-94, 1971.

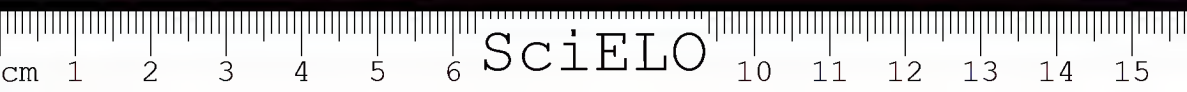
Bôlhas volumosas, tais como se observam no pênfigo humano, não puderam, entretanto, ser obtidas experimentalmente no macaco, sendo razoável supôr que a presença de numerosos folículos pilosos nas áreas cutâneas injetadas possam de certo modo impedir o desenvolvimento das microbôlhas. Experiências em curso visam, por isso, esclarecer a especificidade das bôlhas relativamente grandes que podem ser obtidas mediante a injeção repetida de sôros de PFB na mucosa oral de primatas. A ação lesiva da fração IgC dos sôros de PFB ou de frações purificadas obtidas por meio de imunoadsorventes específicos está sendo também investigada.

SUMMARY — Intraepidermal changes resulted from intradermal injections of rabbits and monkeys with sera of patients suffering from Brazilian Pemphigus Foliaceus (BPF) which contained ligh titers of pemphigus intercellular immunofluorescent antibodies.

In the rabbit experiments the intradermal injection of serum was followed immediately by treatment with a 1% or 2% solution of 2,4 dinitrochlorobenzene. With one selected serum (Serum N.° 1) intraepidermal lesions similar to those seen in human pemphigus were demonstrated both by immunofluorescence and by histopathology. Three other sera produced intraepidermal clefts without acantholytic cells and the same behavior was shown by Serum N.° 1 after "aging" in the laboratory in the frozen state at – 20.°.

11 BPF sera were tested for their ability to transfer the characteristic epidermal lesion of pemphigus to monkeys.

Sera were injected one, two or three times in the same intradermal site. Intraepidermal acantholytic micro bullae were frequently observed following two or three injections of sera with high intercellular antibody titers, but only occasionally following one single injection.

UNITERMS — Pemphigus Foliaceus; Passive Transfer of Pemphigus-like Lesions; Autoimmunity in Pemphigus Foliaceus.

BIBLIOGRAFIA

1. BEUTNER, E. H. & JORDAN, R. E., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **117**: 505 1964.
2. BEUTNER, E. H., PRIGENZI, L. S., HALE, W., LEME, C. A. & BIER, O. G., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **127**: 81, 1968.
3. LEME, C. A., *O Hospital*, **65**: 1081, 1964.
4. BEUTNER, E. H., CHORZELSKI, T. P. & JORDAN, R. E., "Autosensitization in pemphigus and bullous pemphigoid". Charles Thomas, Springfield, Ill., 1970.
5. BEUTNER, E. H., LEVER, W. F., WITEBSKY, E., JORDAN, R. E. & CHERTOK, B., *J. Am. Med. Ass.*, **24**: 682, 1965.
6. CHERTOK, B., "Skin Testing of Animals with Sera from Patients with Pemphigus Vulgaris using Immunofluorescent Techniques". Thesis, School of Medicine, State University of New York at Buffalo, 1967.
7. SAMS, W. M. & JORDAN, R. E., Resultados não publicados.
8. GROB, P. J. & INDERBITZEN, T. M., *J. Invest. Dermatol.*, **49**: 367, 1967.
9. SHU, S. & BEUTNER, E. H., *Federation Proceedings*, **29**(1): 373, 1970.
10. INDERBITZEN, T. M. & GROB, P. J. *Int. Arch. Allergy*, **33**: 576, 1968.
11. CHORZELSKI, T. P., BEUTNER, E. H. & JARZABEK, M., Proc 2nd. *Int. Symp. Immunodermatol.*, **39**, 1970.
12. CHORZELSKI, T. P., BEUTNER, E. H. & JARZABEK, M. *Int. Arch. Allergy & Appl. Immunol.*, **39**: 106, 1970.
13. BEUTNER, E. H., *Ann. N. Y. Ac Sc.*, **177**: 506, 1971.

Recebido para publicação em 20 de dezembro de 1971.

Mem. Inst. Butantan
35: 95-105, 1971.

ESTUDO COMPARATIVO DA ALERGIA TUBERCULÍNICA E DA PROTEÇÃO CONFERIDA PELA VACINA BCG, VIA ORAL E INTRADÉRMICA, EM COBAIOS

BRUNO SOERENSEN *, JANDYRA PLANET DO AMARAL **, MARTHA MARIA MUTTI PEREIRA *** e MARIA ANTONIETA DA SILVA ***

Serviços de Contrôle e Técnicas Auxiliares e de Bacteriologia
Instituto Butantan

RESUMO — Foram administradas doses equivalentes de BCG em grupos de cobaios pelas vias oral e intradérmica.

Um terceiro grupo não vacinado serviu de contrôle.

A capacidade alergizante dos dois métodos de vacinação foi verificada através da reação à tuberculina.

45 dias após a vacinação, os animais vacinados e os do grupo contrôle foram submetidos à inoculação de prova com pequena e grande carga da cêpa virulenta H37.Rv, por via traqueal. A observação dos animais vacinados mostrou que a capacidade alergizante da vacina BCG administrada pela via intradérmica (0,1 mg) foi superior à da vacina administrada pela via oral.

Embora a vacinação pela via oral tenha induzido certo grau de resistência, os dados experimentais indicam que, na cobaia, a administração de 0,1 mg de BCG pela via intradérmica tem poder imunizante superior ao da vacinação oral em 100 mg.

UNITERMOS: BCG; Tuberculose experimental; Imunização contra a tuberculose; BCG e alergia tuberculínica.

A vacinação BCG por via oral foi proposta originalmente por Calmette. Posteriormente, passou-se a utilizar a via parentérica, em particular, a vacinação intradérmica, que foi adotada em numerosos países inclusivamente na França.

A via oral tem a seu favor a simplicidade de execução, porém, é vista com reserva por vários experimentadores, em virtude de despertar alergia tuberculínica em grau menor do que o provocado pela vacinação intradérmica.

A absorção e difusão do BCG pela via digestiva em animais de laboratório foi verificada, entre outros, por Nélis (13-14) através do reisolamento do sangue e pulmão de cobaios jovens; por Gernez-Rieux e col. (7), pela recuperação do

---

Trabalho realizado com o auxílio do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan.
* Diretor do Serviço de Contrôle e Técnicas Auxiliares do Instituto Butantan.
** Diretor da Divisão de Microbiologia — Diretor Geral do Instituto Butantan.
*** Assistentes do Serviço de Bacteriologia do Instituto Butantan.

BCG na linfa do canal torácico de cobaios; por Archipova (2), em experiências com BCG marcado com P_{32} e inoculado pelas vias intradérmica, subcutânea e oral em cobaios. Esta última técnica permitiu estabelecer que o BCG, administrado pela via oral, já é encontrado no sangue e nas vias linfáticas 30 minutos após.

A absorção do BCG através da via digestiva também foi verificada no homem por Zeyland e Piasecka-Zeyland (16) pelo isolamento dos linfonodulos mesentéricos de crianças que faleceram de outras causas que não a tuberculose, bem como por Calmette e col. (4), ao verificarem a presença do BCG no sangue de crianças após a ingestão da vacina.

Quanto à proteção da vacina administrada pela via oral em cobaios, Amaral e Soerensen (1) verificaram um aumento do tempo de sobrevida na tuberculose experimental.

Kreis (8), comparando a eficiência do BCG oral e intravenoso em camundongos, refere que o grau de proteção conferido é o mesmo com ambas as vias, porém Nagata (11), trabalhando com coelhos, assinala maior proteção dos animais inoculados com doses repetidas de BCG pela via intradérmica do que pela via oral. Drabkine e Sukhodolskaya (5), concluem que doses repetidas de BCG oral podem conferir a cobaios resistência à infecção tuberculosa semelhante à conferida pelo método de escarificação.

Finalmente, diversos autores verificaram à necrópsia de cobaios prèviamente vacinados com BCG por diversas vias, diferenças apreciáveis com relação ao grupo não vacinado, indicando maior grau de resistência para os primeiros (3, 12, 9, 6, 15).

No presente trabalho procuramos verificar comparativamente o efeito protetor e a capacidade alergizante da vacina BCG administrada pela via oral e pela via intradérmica em cobaios.

MATERIAL E MÉTODOS

Verificação da proteção conferida pela vacina BCG, por via oral ou intradérmica, ante a inoculação de prova de grande carga bacilar (8 *milhões de bacilos*)

Utilizamos três grupos de cobaios machos, pesando aproximadamente 350 g.

O primeiro grupo de 86 animais recebeu 100 mg de BCG em 5 ml, pela via oral, através de sonda esofagiana (sonda uretral gomada n.º 7). O segundo grupo de 83 animais recebeu 0,1 mg de BCG em 0,1 ml., pela via intradérmica. O último grupo de 78 cobaios não recebeu vacina, servindo de contrôle.

A vacina usada foi preparada no Instituto Butantan com a cêpa Moreau.

Com a finalidade de observar o tempo de sobrevida dos três grupos de cobaios, administramos, após 45 dias de imunização, uma grande carga bacilar de H37.Rv em 0,1 ml., por via traqueal (8 milhões de bacilos), obedecendo à técnica descrita por Lorian (10).

Os animais pertencentes aos três grupos foram conservados em idênticas condições e, para cada grupo, determinou-se a percentagem de mortalidade, através de um período de 130 dias, ao fim do qual, o grupo contrôle já havia atingido 100% de letalidade. Todos os animais foram necropsiados a fim de serem submetidos a estudo anatomopatológico.

Verificação da capacidade alergizante conferida pela vacina BCG, vias oral e intradérmica, e da proteção ante a inoculação de prova de pequena carga bacilar (1 *a* 10 *bacilos*).

Utilizamos também três grupos de cobaios: o primeiro, de 78 animais, recebeu 100 mg de BCG pela via oral; o segundo, de 80 animais, recebeu 0,1 mg de BCG em 0,1 ml pela via intradérmica e o terceiro, de 88 cobaios, serviu de contrôle.

45 dias após a vacinação, todos os grupos foram submetidos à prova tuberculínica, mediante a injeção intradérmica de tuberculina OT diluída a 1/10 (aproximadamente, 1000 U.T.).

48 horas depois, procedeu-se à leitura da reação e, logo a seguir, administrou-se pequena carga bacilar de H37.Rv, representada por 1 a 10 bacilos em 0,1 ml, por via traqueal.

Os animais pertencentes aos três grupos foram mantidos em idênticas condições, sendo determinada a letalidade para cada grupo durante o período de 210 dias, quando a letalidade dos diferentes grupos de cobaios proporcionou dados capazes de permitir uma avaliação da proteção. Todos os animais foram necropsiados e submetidos a exame anatomopatológico.

RESULTADOS

Os resultados da primeira série de experiências, resumidos na Tabela I e no Gráfico correspondente (Fig. 1), permitem uma estimativa aproximada do grau de proteção conferido pela vacina administrada pelas duas vias, ante a inoculação de prova de uma grande carga bacilar. É interessante destacar três pontos principais: 1) Pràticamente durante todo o período de observação, a letalidade no grupo que não recebeu BCG foi superior à dos grupos vacinados. 2) A proteção dos grupos de animais vacinados pelas vias oral e intradérmica foi mais ou menos a mesma. 3) A percentagem de cobaios que, ao exame macroscópico, revelou comprometimento tuberculoso, foi maior no grupo contrôle que nos grupos vacinados, sendo de assinalar que o grupo vacinado pela via intradérmica mostrou percentagem ligeiramente inferior de animais portadores de lesões, quando comparado ao grupo vacinado pela via oral (Tabela III).

TABELA I

PROTEÇÃO DA VACINA B.C.G. VIA ORAL E INTRADÉRMICA EM COBAIOS

(Inoculação de Prova: H.37 Rv 8 milhões de bacilos via traqueal, após 45 dias de transcorrida a vacinação)

VACINAÇÃO	INOCULAÇÃO DE PROVA	PERÍODO DE OBSERVAÇÃO — LETALIDADE												
		10 ds.	20 ds.	30 ds.	40 ds.	50 ds.	60 ds.	70 ds.	80 ds.	90 ds.	100 ds.	110 ds.	120 ds.	130 ds.
BCG. 100 mg oral	H37.Rv. 8 milhões de bacilos	2 2,3%	3 3,4%	8 9,3%	14 16,2%	22 25,5%	31 36,2%	38 44,1%	48 55,8%	56 65,1%	62 72,0%	65 75,5%	69 80,2%	71 82,5%
BCG. 0,1 mg intradérmica	H 37.Rv. 8 milhões de bacilos	5 6,0%	9 10,8%	10 12,0%	14 16,8%	17 20,4%	23 27,7%	34 40,9%	47 56,6%	54 65,0%	61 73,4%	66 79,5%	75 90,3%	78 93,9%
Contrôle (Não vacinado)	H37.Rv. 8 milhões de bacilos	3 3,8%	21 26,9%	35 44,8%	48 61,5%	51 65,3%	56 71,7%	63 82,0%	70 89,7%	73 93,5%	76 97,4%	77 98,7%	77 98,7%	78 100,0%

Fig.I
PROTEÇÃO DA VACINA B.C.G. VIA ORAL E INTRADERMICA EM COBAIOS
(Inoculação de Prova:- H. 37 Rv. (8 milhões de bacilos) via traqueal, após 45 dias de transcorrido a Vacinação.)
LETALIDADE
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130 DIAS
PERÍODO DE OBSERVAÇÃO
Contrôle (H.37. Rv. - 8 milhões de bacilos via traqueal) 78 cobaios.
B.C.G. 100 mg. via oral (H.37 Rv. - 8 milhões de bacilos via traqueal) 86 cobaios.
B.C.G. 0.1 mg. via intradérmica (H.37. Rv. - 8 milhões de bacilos via traqueal) 83 cobaios
( ) Número absoluto de mortos

Numa segunda série de experiências, a capacidade alergizante da vacina administrada pela via oral foi comparada à da via intradérmica, tendo-se verificado uma percentagem de positividade superior na vacinação pela via intradérmica à da vacina administrada pela via oral. O grupo não vacinado não revelou qualquer grau de alergia (Fig. 2).

Fig. 2

ESTUDO COMPARATIVO DA ALERGIA TUBERCULÍNICA DE COBAIOS VACINADOS COM B.C.G. VIA ORAL E VIA INTRADÉRMICA

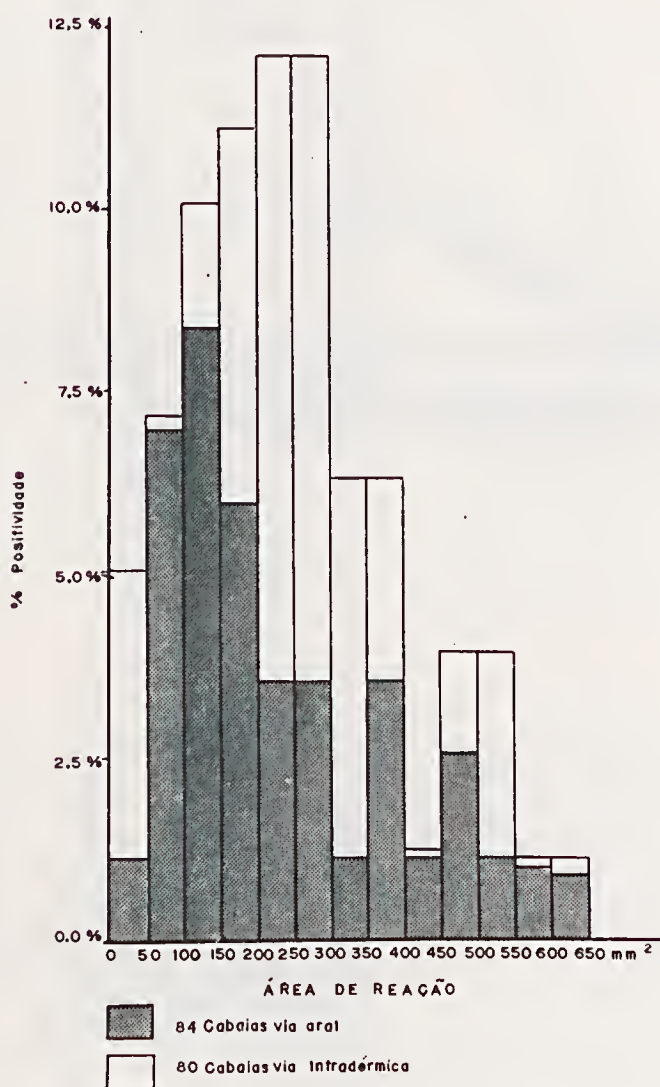
Via oral 100 mg.; via intradérmica 0,1mg.
(Tuberculina bruta 1/10; 45 dias após vacinação)

Quanto ao grau de proteção conferido pela vacina administrada pelas duas vias à inoculação de prova com pequena carga bacilar, cumpre destacar o seguinte: 1) Pràticamente durante todo o período de observação, a letalidade no grupo de animais que não recebeu BCG foi significativamente superior à dos grupos vacinados (Tabela II e Fig. 3). 2) A proteção conferida pela via intradérmica foi superior à conferida pela via oral. 3) A percentagem de cobaios não vacinados que, ao exame macroscópico, revelaram comprometimento tuberculoso, foi superior às percentagens observadas nos vacinados e, nêstes, o grupo que recebeu BCG pela via intradérmica mostrou comprometimento menor que o grupo vacinado pela via oral (Tabela III).

Fig 3
PROTEÇÃO DA VACINA B.C.G. VIA ORAL E INTRADÉRMICA EM COBAIOS
(Inoculação de Prova:-H37Rv (1 a 10 bacilos) via traqueal, após 45 dias de transcorrida a Vacinação)

SOERENSEN, B.; AMARAL, J. P.; MUTTI PEREIRA, M. M. e SILVA, M. A. — Estudo Comparativo da Alergia Tuberculínica e da Proteção Conferida Pela Vacina BCC. Via Oral e Intradérmica em Cobaios. *Mem. Inst. Butantan.* 35: 95-105, 1971.

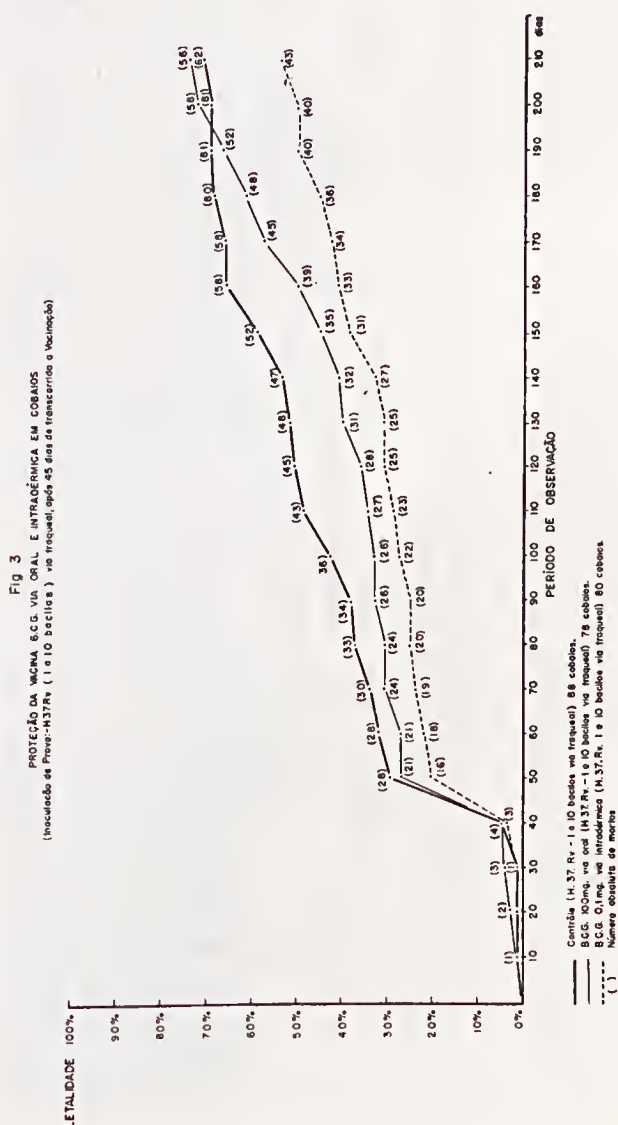



TABELA II

PROTEÇÃO DA VACINA B.C.G. VIA ORAL E INTRADÉRMICA EM COBAIOS

(Inoculação de Prova: H.37 Rv 1 a 10 bacilos via traqueal, após 45 dias de transcorrida a vacinação)

VACINAÇÃO	INOCULAÇÃO DE PROVA	PERÍODO DE OBSERVAÇÃO — LETALIDADE									
		10ds	20 ds	30 ds	40 ds	50 ds	60 ds	70 ds	80 ds	90 ds	100 ds
BCG. 100 mg. oral	H37.Rv. 1 a 20 bacilo	1 1,2%	2 2,5%	3 3,8%	3 3,8%	21 26,9%	21 26,9%	24 30,7%	24 30,7%	26 33,3%	26 33,3%
BCG. 0,1 mg. intradérmica	H37.Rv. 1a 10 bacilos	1 1,2%	1 1,2%	1 1,2%	3 3,7%	16 20,0%	18 22,5%	19 23,7%	20 25,0%	20 25,0%	22 27,5%
Contrôle (Não vacinado)	H 37.Rv. 1a 10 bacilos	1 1,1%	1 1,1%	1 1,1%	4 4,5%	26 29,5%	28 31,8%	30 34,0%	33 37,5%	34 38,6%	38 43,1%

VACINAÇÃO	INOCULAÇÃO DE PROVA	PERÍODO DE OBSERVAÇÃO — LETALIDADE										
		110 ds	120 ds	130 ds	140 ds	150 ds	160 ds	170 ds	180 ds	190 ds	200 ds	210 ds
BCG. 100 mg. oral	H37.Rv. 1 a 20 bacilo	27 34,6%	28 35,8%	31 39,7%	32 41,0%	35 44,8%	39 50,8%	45 57,6%	48 61,5%	52 66,6%	56 71,7%	58 74,3%
BCG. 0,1 mg. intradérmica	H37.Rv. 1a 10 bacilos	23 28,7%	25 31,2%	25 31,2%	27 33,7%	31 38,7%	33 41,2%	34 42,5%	38 47,5%	40 50,0%	40 50,0%	43 53,7%
Contrôle (Não vacinado)	H 37.Rv. 1a 10 bacilos	43 48,8%	45 51,1%	46 52,2%	47 53,4%	52 59,0%	58 65,9%	58 65,9%	60 68,1%	61 69,3%	61 69,3%	62 70,4%

TABELA III

PERCENTAGEM DE COBAIOS COM LESÕES MACROSCÓPICAS APÓS A VACINAÇÃO ORAL OU INTRADÉRMICA

INOCULAÇÃO DE PROVA: H37.Rv VIA TRAQUEAL	GRUPOS IMUNIZADOS				GRUPO CONTRÔLE	
	BCG 0,1 mg. i.d.		BCG 100 mg. oral			
	Total	% com lesões	Total	% com lesões	Total	% com lesões
8 milhões de bacilos	64	87,5	69	89,8	77	94,8
1 a 10 bacilos	29	44,8	34	58,8	49	79,5

SOERENSEN, B.; AMARAL, J. P.; MUTTI PEREIRA, M. M. & SILVA, M. A. — Estudo Comparativo da Alergia Tuberculínica e da Proteção Conferida Pela Vacina BCC. Via Oral e Intradérmica em Cobaios. *Mem. Inst. Butantan.* 35: 95-105. 1971.

CONCLUSÕES

1) A capacidade alergizante da vacina BCG administrada pela via intradérmica (0,1 mg) é superior à da vacina administrada pela via oral. 2) A protcção da vacina avaliada através da letalidade ante uma inoculação de prova de grande carga bacilar não revelou diferença apreciável quanto aos dois métodos de vacinação, porém, quando a inoculação de prova foi de pequena carga bacilar, o método intradérmico mostrou-se superior ao método de vacinação oral. 3) o grau de proteção, avaliado pela percentagem de cobaios que, ao estudo macroscópico, revelou lesões tuberculosas ante uma inoculação de prova com grande ou pequena carga bacilar, evidenciou a superioridade da vacinação pela via intradérmica. 4) Destas observações parece lícito concluir que o método de vacinação BCG intradérmico (0,1 mg) revela capacidade imunizante superior à do método oral (100 mg), embora êste também seja capaz de induzir certo grau de proteção.

SUMMARY — Three groups of guinea-pigs were used: Groups I and II received BCG doses, respectively by the oral and intradermel route, equivalent to those used fou human vaccination, and Group III included unvaccinated controls.

The allergic reactivity of the vaccinated groups was determined by the tuberculin test.

After a certain period of time, all vaccinated and control animals were challenged by tracheal inoculation of low and high concentrations of the H37Rv strain of *M. tuberculosis*. Examination of the two vaccinated groups showed that the allergic reactivity was higher in the intradermally vaccinated group than in the oral immunized animals.

The conclusion is drawn that guinea-pigs injected intradermally with 0,1 mg BCG showed a higher degree of resistance to virulent. *M. tuberculosis* when compared to the group which received 100 mg of BCG by mouth.

However, when Groups I and III were compared, conspicuous degree of protection was found, provided the challenge was made with a small amount of virulent bacilli.

UNITERMS: BCG; Experimental Tuberculosis; Imunization against Tuberculosis; BCG and Tuberculin Allergy.

BIBLIOGRAFIA

1 — AMARAL, J.P. E SOERENSEN, B. — BCG por via oral em cobaios. — *O Hospital* 58: 1053-1057, 1960.

2 — ARCHIPOVA, O.P. — Streni BCG znachovanych 32P. v organismu morcat ponitrokozni podkozni a peroralni vakeinaci. — *Rozhl Tuberk*, **24**: 59-61, 1964.

3 — CALMETTE, A., BOQUET, A. et NÈGRE, L. — oCntribution à l'étude du bacile tuberculeux bilié. — *Ann. Inst. Pasteur*, **35**: 561-564, 1921.

4 — CALMETTE, A., WEILL-HALLÉ, B., SAENZ, A. et COSTIL, L. — Démonstration expérimentale du passage des bacilles-vaccins BCG à travers la muqueuse de l'intestin chez le singe. — *Bull. Acad. Med.*, **110**: 203-206, 1933.

5 — DRABKINE, R. O. and SUKHODOLSKAYA, A. E., cit. ROSENBERG J. e ROCHA, PASSOS FILHO, M.C. — Vacinação BCG pela técnica oral. A propósito da "Revisão crítica das pesquisas sôbre vacinação com o BCG oral" da Unidade de Tuberculose da Divisão de Doenças Transmissíveis da OMS — *O Hospital*, **78** (1): 101-174, 1970.

6 — FRAPPIER, A., MARTINEAU, B. et DOBIJA, M. — Le nodule de surinfection et degré de résistance em tuberculose expérimentale. — *Ann. Inst. Pasteur*, **87**: 131-140, 1954.

7 — GERNEZ-RIEUX, C., TAEQUET, A., GERARD, A., FABRE, A. et PIAT, M. — Vacination antituberculeuse par voie digestive chez les sujets allergiques. — *Rev. Tuberc.* (Paris) **18**: 677-680, 1954.

8 — KREIS, B. — Sur la vaccination BCG par voie bucalle. — *Rev. Tuberc. Pneumol.* (Paris) **25**: 517-522, 1961.

9 — LIEBOW, A.A., BURN, C.G. and SOPER, W.B. — Comparasion of the effects of BCG and of heat-killed organisms on the course of a subsequent infection with virulent tubercle bacilli in the guinea-pig. *Am. Rev. Tuberc.*, **41**: 592-598, 1940.

10 — LORIAN, V. — Experimental intrabronchial administration of antibiotics in man and animals. — *Acta Tuberc. Pneumol. Scand* **42**: 149-157, 1962.

11 — NAGATA, K. — On the behaviour of tuberculin allergy and its infection preventive power induced by continous administration of BCG. — *Acta Pediat. Jap.* **64**: 170-176, 1960.

12 — NÈGRE, L. BRETEY, J. et ROY, D. — Étude de l'allergie à la tuberculine et de l'infra-allergie aux bacillaires dans leurs rapports avec la resistance antituberculeuse chez des cobayes vaccinés par ingestion de grosses doses de BCG. — *Ann. Inst. Pasteur*, **98**: 1-6, 1960.

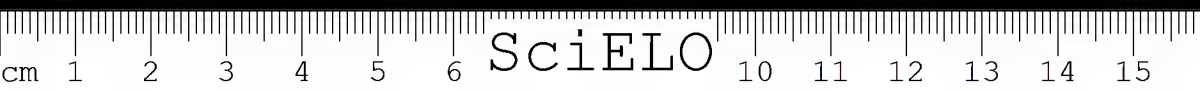
13 — NÉLIS, P. — L'absorption du BCG per os chez le jeune lapin. — *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **105**: 188-193, 1930.

14 — NÉLIS, P. — Sur l'absorption du BCG administré per os au cabaye nouveau-né. — *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **104**: 1187-1188, 1930.

15 — SOERENSEN, B. e AMARAL, J. P. — Estudo comparativo de necropsias em cobaios tuberculosos e cobaios tuberculosos prèviamente vacinados com BCG via oral. — *O Hospital*, **65**: 287-292, 1964.

16 — ZEYLAND, M. J. et PIASECKA-ZEYLAND, E. — Sur la pénetration des bacilles a travers la paroi du tube digestif d'après les autopsies des enfants vaccinés ao BCG par voie buccale. — *Ann. Inst. Pasteur*, **42**: 61-66, 1928.

Recebido para publicação em 25 de novembro dc 1971.

Mem. Inst. Butantan
35: 107-109, 1971.

MICRURUS HEMPRICHII HEMPRICHII RECORDED FOR BRAZIL *
(Serpentes Elapidae)

A. R. HOGE and S. A. ROMANO
(Seção de Herpetologia, Instituto Butantan).

ABSTRACT: *Micrurus hemprichii hemprichii* (Jan) is recorded for Brazil. The study of avaiable specimens shows that *Micrurus hemprichii hemprichii* occurs in the lowlands of medium and lower Amazon, Guianas, and Orenoco drainage; *Micrurus hemprichii ortoni;* Schmidt, occuring on the higher places of the Upper Amazon drainage.

UNITERMS:

Micrurus hemprichii hemprichii

(Serpentes Elapidae);

States of Pará and Amazonas (Brazil);

Micrurus hemprichii ortoni. Tefé, Amazonas (Brazil).

Till now the only record of *Micrurus hemprichii* for Brazil was based on a specimen mentioned by Schmidt (1953:165-166), from "Belém", without number in the Munich collection. This specimen was identified by Schmidt as *Micrurus hemprichii ortoni,* but the locality "Belém" so far away from the range of this subspecies suggested to him that the specimen was either transported by man or by rafting from the upper Amazon.

Three specimens now available permit us to give some additional information about the distribution of *Micrurus hemprichii*.

Micrurus hemprichii Jan.

1858 *Elaps hemprichii* Jan, Rev. Mag. Zool., **10**:523.

1929 *Micrurus hemprichii*; Amaral, Mem. Inst. Butantan, **4**:230.

Distribution: Northern south America east of the Andes.

Content: Two subspecies.

---

* Supported by a Grant of Conselho Nacional de Pesquisas and National Library of Medicine.
Adress:
C. P. 65, São Paulo, Brazil.

Micrurus hemprichii hemprichii

1953 *Micrurus hemprichii hemprichii*; Schmidt,, Fieldiana Zool., **34**:166.

1970 *Micrurus hemprichii hemprichii*; Roze in Peters et Orejas U.S.N.M. **297**:210.

Type locality: Colombia.

Range: Eastern Colombia, southern Venezuela, the Guianas, and Brazil from the State of Pará to Amazonas (Manaus).

Material: IBH,, 20.678, from Km 86 on the Belém-Brasília road, State of Pará, Brazil, Gol. E. Dente, 7-1960. INPA, 1.160, "Reserva Duke" near Manaus, Amazonas, Brazil, Col. A. C. Maranhão Nina.

Description: IBH, 20.678, a ♀; dorsals 15-15-15; ventrals 166; anal undivided; 30/30 subcaudals; 7-7 upper labials. Head 9 mm; body 205 mm; tail 22 mm. Seven and 1/3 triads on body and 1 on tail. INPA, 1.160, a ♂; dorsals 15-15-15; ventrals 183; anal undivided; 28/28 subcaudals; 7-7 upper labials; 7-7 lower labials. Head 18 mm; body 670 mm; tail 60 mm; 8 triads on body and 1 on tail. The scales of nuchal collar bordered with black.

Micrurus hemprichii ortoni

1953 *Micrurus hemprichii ortoni* Schmidt, Fieldiana Zool. **34**:166.

1970 *Micrurus hemprichii ortoni,* Roze in Peters et Orejas U.S.N.M. bul., **297**:210.

Type locality: Pebas, Peru.

Range: Amazonian slopes of southern Colombia, Equador; Peru, Bolivia and Brazil (Tefé, State of Amazonas, Brazil). The specimen from Belém mentioned by Schmidt is obviously not from this locality.

Material: A single specimen from Tefé, Amazonas, Brazil, Col. by A. R. Hoge and J. D Cavalheiro, 9-23-52, a ♀, dorsals 15-15-15; ventrals 181; 23/23 subcaudals; anal undivided; 7-7 upper labials; 7-7 lower labials. Head 9 mm; body 208 mm; tail 19 mm. Six triads on body and 1 on tail.

Discussion — The wide gap between the areas of distribution of the subspecies mentioned by Schmidt no longer exists. Is is interesting to note that all known specimen of *M. hemprichii ortoni* (exception of the Munich specimen already mentioned) are from the highlands, and the *M. hemprichii hemprichii* from the lower parts of the Amazon from the Guianas and Orenoco drainage.

HOGE, A. R. and ROMANO, S. A. — *Micrurus hemprichii hemprichii* recorded for Brazil. *Mem. Inst. Butantan,* 35: 107-109, 1971.

RESUMO: — Ficou registrada a ocorrência de *Micrurus hemprichii hemprichii* (Jan) no Brasil. Com os exemplares estudados, as áreas de distribuição da subspecies, antes extremamente afastadas, ficaram próximas. *Micrurus hemprichii hemprichii* (Jan) ocorre nas terras baixas do médio e baixo Amazonas, Guianas e Bacia do Orenoco.

UNITERMOS:

Micrurus hemprichii hemprichii (Serpentes Elapidae);

Estados do Pará e Amazonas (Brasil);

Micrurus hemprichii ortoni, Tefé, Amazonas (Brasil).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to the Conselho Nacional de Pesquisas for a Grant awarded to the junior author; to the National Library of Medicine grant LM 00418-01. To Dr. Afonso Celso do Maranhão Nina from the Instituto Nacional de Pesquisas Amazonas for the loan of specimens; and to Dr. Ramon A. Lancini from the Museo de Ciências Naturales de Caracas for the loan and gift of specimes.

BIBLIOGRAPHY

AMARAL, A. — Estudos sôbre ophidios neotrópicos. XVIII — Lista Remissiva dos ophidios da região neotrópica — *Mem. Inst. Butantan,* **4**: 230, 1929.

JAN, G. — Plan d'une iconographie descriptive des ophidiens et description sommaire de nouvelles espècies de serpents. *Rev. Mag. Zool.,* ser. 2, **10**: 523, 1958.

ROSE, J. in PETERS et OREJAS — Catalogue of the Neotropical Squamata — Part I — Snakes — *U. S. Nat. Mus.,* bulletin **297**: 210, 1970.

SCHMIDT, K. P. — Hemprich's coral snake. Micrurus hemprichii. *Fieldiana — zoology* — **34**, n.° 13: 165-166, 1953.

Recebido para publicação em 14 de setembro de 1971.

Mem. Inst. Butantan
35: 111-115, 1971.

NOTES ON *LEPTOMICRURUS* SCHMIDT *

(*Serpentes Elapidae*)

SYLVIA ALMA R. W. L. ROMANO
(Seção de Herpetologia, Instituto Butantan)

ABSTRACT — The genus *Leptomicrurus* Schmidt is synonymized with *Micrurus* Wagler.

Micrurus collaris (Schlegel) is recorded for the first time from Brasil. The specific name *schmidti* is changed (nom. nov.) to *karlschmidti* on the grounds of the homonymy raised by the inclusion of the former *Leptomicrurus schmidti* in the genus *Micrurus*.

UNITERMS: *Leptomicrurus* Schmidt (Serpentes Elapidae)

Presence of annuli; *Leptomicrurus* synonymized with *Micrurus* Wagler.

In previous publication Hoge and Romano, 1966, described a new species, *L. schmidti,* from Tapurucuàra, Amazonas, Brazil, and recorded definetly *L. narduccii* from the State of Acre, Brazil.

Three specimens of *Leptomicrurus* now available enable us to give some additional information.

Schmidt (1937: 377) based his new genus *Leptomicrurus* on the meeting of mental and chin shields and on the presence of ventral spots without tendency to form annuli. The first character, or meeting of mental and chin shields is adventitious in several species of *Micrurus* (Schmidt, 1936: 200, and 1937:363). Actually the absence of rings was the only distinctive character between *Micrurus* and *Leptomicrurus.*

Two specimens of *Micrurus narduccii* from Brazil, Amazonas, show reddish annuli on the anterior part of the body.

Museum Bocage n.º 1401 a, dorsals 15-15-15; 266 ventrals; anal divided; 19/19 subcaudals; 7-7 upper labials; temporals 1+1; 7-7 lower labials. Length of head 8,7 mm, body 380 mm, tail 20 mm. The lst and 2 nd ventral blotches are in contact dorsally forming complete annuli, although very narrow on dorsum. The 3 th and 4th forming nearly complete annuli; the remaining, although not forming distinct annuli, are joined on the dorsum by a series of whitish spots. All ventral blotches reach the 4th, 5th, or even 6th dorsal row, forming triangular lateral blotches.

---

* Supported by a grant of Conselho Nacional de Pesquisas
Address. C. P. 65, São Paulo, Brazil

Museum Bocage 1401 b, dorsals 15-15-15; 257 ventrals, anal divided; 13/14 +n subcaudals; 7-7 upper labials; lower labials mutilated; length of head 9,7 mm; body 4,5 mm; tail 15 + n mm. The first 8 annuli complete, dorsally constricted at (1-3 scales long); the annuli 8 to 14 incomplete but connected dorsally by indistinct whitish spots. The remaining ones are separated; 4 complete annuli on tail. In this specimen large black rings alternate with smaller ones, giving the impression of triads.

Consequently none of the characters used to separate *Micrurus* from *Leptomicrurus* are stable and *Leptomicrurus* should return to the synonymy of *Micrurus.*

It should be mentioned that the temporal formula of O+1 used by Schmidt and all subsequent authors, is also a variable character, as observed in a specimen of *collaris* (O+1 on one side and 1+1 on the other).

Micrurus collaris (Schlegel)

1837 *Elaps collaris* Schlegel, Essai Physion. Serp., **1**:181; **2**:448.

1844 *Elaps gastrodelus* Duméril, Bibron et Duméril, Erp. Gen. **7**(2): 1212 — Type locality: unknown.

1881 *Elaps collaris*; Kappler, Holländish Guiana. Erg. v. Erf. etc. 167.

1886 *Hemibungarus collaris*; Boettger, Ber. Senck. Natf. Ges. 1885/1886: 117.

1937 *Leptomicrurus collaris*; Schmidt, Zool. Ser. Field Mus. Nat. Hist. XX n.º **26**:361-354.

1966 *Leptomicrurus collaris*; Hoge ct Romano, Mem. Inst. Butantan (1965); **31**:4, fig. 3,3 a-c.

1969 *Leptomicrurus collaris;* Hoge et Romano, Ciência e Cultura, **21**(2): 454.

Type locality: designated (Hoge ct Romano, 1966), the Guianas.

Distribution: South-eastern Venezuela; the Guianas and State of Pará, Brazil.

Material:A single specimen IBH.25.593, a ♂ from Icoarací, Belém, State of Pará, Brazil.

Micrurus karlschmidti nom. nov. *

1966 *Leptomicrus schmidti* (error typographicus pro *Leptomicrurus*) Hoge ct Romano, Mem. Inst. Butantan. **32(1965)**:1, fig. 2,2 a-c.

Type locality: Tapurucuàra, Mun. Uaupés, State of Amazonas, Brazil.

Distribution: Only known from type locality.

---

* nom. nov. pro *Leptomicrurus schmidli* Hoge et Romano preocupied by *Micrurus schmidti* Dunn, 1940 and *Micrurus schmidli* (now putumayensis) Lancini, 1962.

Micrurus narduccii (Jan)

1863 *Elaps narducii* Jan, Arch. Zool. Anat. Fis. **2**:222.

1870 *Elaps scutiventris* Cope, Proc. Amer. Phil. Soc. **11**(1869):156 — Type locality: Pebas, Peru.

1881 *Elaps melanotus* Peters, Sitzl. Ges. Naturforsh. Freunde, Berlin, **1881**:51 — Type locality —: Sarayacu, Equador.

1937 *Leptomicrurus narducci;* Schmidt, Zool. Ser. Field. Mus. Nat. Hist. **20**:363.

1966 *Leptomicrurus narducci*; Hoge et Romano, Mem. Inst. Butantan, **32**(1965):5, fig. 1,1 a-c.

Type locality: Bolivia.

Distribution: Amazonian slopes of the Andes in Southern Colombia; Equador; Peru; Bolivia and Brazil, States of Acre and Amazonas.

Material: two specimes, M. Bocage, N.º 1.401 from Brazil, State of Amazonas; dorsals 15-15-15; ventrals 266; subcaudals 19/19; 7-7 upper labials; 7-7 lower labials. Length of head 8,7 mm; body 380 mm; tail 20 mm. There are two distinct annuli on anterior part of body (fig. 1 and 2). N º 1401, b, same locality; dorsals 15-15-16; ventrals 257; 13/13 + n subcaudals; 7-7 upper labials.

RESUMO: O gênero *Leptomicrurus* Schmidt é colocado na sinonímia de *Micrurus* Wagler.

Micrurus collaris é registrado pela primeira vez para o Brasil.

O nome específico *schmidti* é mudado para *karlschmidti* (nom. nov.), em razão da transferência da espécie para o gênero *Micrurus* (homônimo de *M. schmidti* Dunn 1940 e *M. schmidti* Lancini 1962)

UNITERMOS: *Leptomicrurus* Schmidt (Serpentes Elapidae); Presença de anéis; O gênero *Leptomicrurus* passa para *Micrurus* e *M. karlschmidti.*

ACKNOWLEDGEMENTS — We are indebted to Mr. J. A. Fernandes, Museu Bocage, for the loan of specimens.

Fig. 1

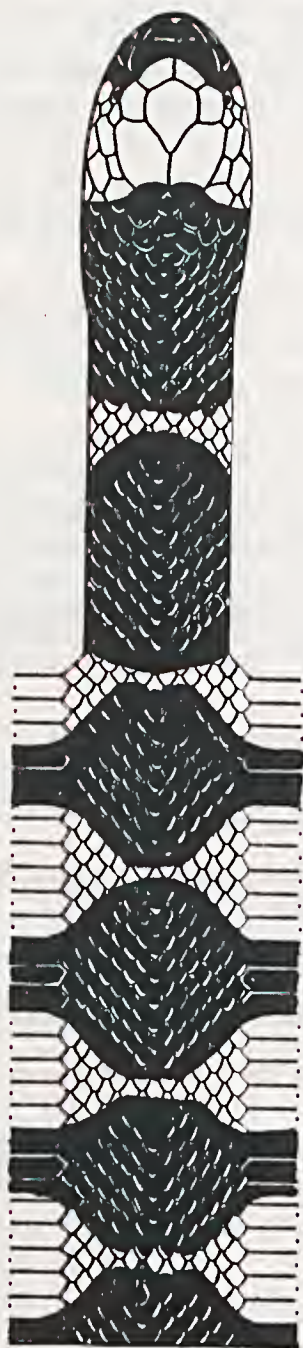



Fig. 2

BIBLIOGRAPHY

BOETTGER, O. — Aufzählung der von den Phillipinen bekannten Reptilien und Batrachien — *Ber. Senck. Gesch.,:* 117, 1886.

COPE, E. D. — Seventh Contribution to the Herpetology of Tropical America — *Proc. Amer. Phil. Soc.* — **11** (1869): 156, 1870.

DUMÉRIL, A. M. C., BIBRON, G. et DUMÉRIL, A. — Erpétologie Genérale ou Histoire Naturelle complète des Repiles — **7** (2): 1212, 1854.

HOGE, A. R. and ROMANO S. A. R. W. D. L. — *Leptomicrurus* in Brazil (Serpentes — Elapidae) — *Mem. Inst. Butantan,* **32***:* 1-8, 1966.-

HOGE, A. R. and ROMANO, S. A. R. W. D. L. — Espécies registradas para o Brasil (Serpentes) — *Ciência e Cultura,* **21**, n.º 2: 454, 1969.

JAN, G. — Prodromo della Iconografia Generale degli ofidi — II — *Arch. Zool. II* fasc. II: 12-14, 1863.

KAPPLER, A. — Hollandisch — Guiana — Erlebnisse und Erfahungen während eines 43 jähringen Aufenthalts in der Kolonie Surinam — Suttgart, W. Kohlhammer, x + 495, frontsp.: 166-167, 1881.

PETERS, W. — Über das Vorkommen schildförmiger Verbreiterungen der Dornfortsätze bei Schlangen und über neue oder weniger bekannte Arten dieser Abteilung der Reptilien — *Sitzungsber Ges. Naturf. Freunde,* Berlin —: 49-52, 1881.

SCHLEGEL, H. — Essai sur la physionomie des serpens — *I:* 181; II: 448, 1837.

SCHMIDT, K. P. — The history of *Elaps collaris* Schlegel 1837 — *Zool. Ser. Field Mus. Nat. Hist. XX* n.º **26***:* 361-363, 1937.

Recebido para publicação em 14 de setembro de 1971

Mem. Insti Butantan
35: 117-138, 1971.

REVISÃO DE ALGUNS TIPOS DE ARANHAS CARANGUEJEIRAS (*ORTHOGNATHA*) ESTABELECIDOS POR CÂNDIDO DE MELLO LEITÃO E DEPOSITADOS NO MUSEU NACIONAL DO RIO.

WOLFGANG BUCHERL *; ANNA TIMOTHEO DA COSTA ** e SILVIA LUCAS ***

(Seção de Artrópodos Peçonhentos, Instituto Butantan)

RESUMO: — Pelo reestudo do material típico de aranhas da subordem *ORTHOGNATHA* encontradas na antiga coleção catalogada por C. de Mello Leitão no Museu Nacional do Rio, constatamos:

CTENIZIDAE, ACTINOPODINAE: Actinopus rufibarbis M. L. 1930, *A. paranensis* M. L. 1923 e mais um especimen etiquetado sob o nome de "*A. niger*" pertencem ao grupo de *A. crassipes* (Keyserling) 1891;

CTENIZINAE, Idiops nilopolensis M. L. 1923, pode ser considerada especie boa e *Idiops crulsi* M.L. 1930 e um especimen etiquetado sob o nome de "*Idiops anomalus*" são sinônimos de *Idiops petitii* (Guérin) 1938.

DIPLURIDAE, DIPLURINAE a espécie *Diplura bitaeniata* M. L. 1941, ainda sem receptáculos seminais, parece-nos sinônima de *D. aequatorialis* Auss. 1871, que é da mesma região do tipo da segunda; *D. borgmeieri* M. L. 1924 é sinônima de *D. gymnognatha* Bertkau 1880, ambas do mesmo local típico; *D. fallax* M. L. 1926 deve ser enquadrada sob o gênero *Uruchus*, com o nome de *Uruchus fallax* (M. L.) 1926; *Diplura nigerrima* M. L. 1941 é apenas uma variação de colorido de *D. aequatorialis*. O exemplar tinha mudado de pele, sendo, por isso, seu colorido mais vivo.

Harmonicon nigridorsi M. L. 1924 é espécie boa. *Thalerothele aurantiaca* M. L. 1943 e *Th. minensis* M. L. 1926 são sinônimos de *Th. uniformis* M. L. 1923, com o mesmo local típico e *Th. sanguinea* (F. Cambridge) 1896 parece-nos sinônimas de *Th. annectens* (Bertkau) 1880, também do mesmo biotopo. Especimens etiquetados com o nome de "*Uruchus costatus*" são fêmeas jovens, sem receptáculos seminais formados e devem ser considerados como sendo do grupo de *Uruchus jelskii* (F. Cambridge) 1896; na subfamília das *MACROTHELINAE Ischnothele sexpunctatum* e *I. zoroda*, descritas por Mello Leitão em 1941 e 43 respectivamente, parecem-nos espécies boas.

THERAPHOSIDAE, AVICULARINAE: Avicularia cuminami M. L. 1930 e *A. pulchra* M. L. 1933, cada espécie foi

---

* Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas
** Seção de Invertebrados do Museu Nacional de Rio de Janeiro
*** Seção de Artrópodos Peçonhentos — Instituto Butantan

descrita com uma fêmea jovem, ainda sem bôlsas receptaculares; *A. palmicola* M. L. 1945 parece-nos espécie boa. *GRAMMOSTOLINAE: Pterinopelma vellutinum* M. L. 1923 e *Pt. dubium* M. L. 1923 são sinônimos de *Pt. wacketi* M. L. 1923, todos do mesmo local típico.

ISCHNOCOLINAE: Cyriocosmus semifasciatus M. L. 1939 é *Chaetorrhombus semifasciatus* (M. L.) 1939; *Aphantopelma venosum* M. L. 1936 é espécie boa; *Phormictopus multicuspidatus* M. L. 1929 é *Cyclosternum multicuspidatum* M. L. 1929, de que é sinônimo também um exemplar etiquetado sob o nome de *"Magulla atrogaster"; Cyclosternum schmardae* Auss. 1871 é espécie boa e *C. semiaurantiacum* Simon 1897 é *Ceropelma semiaurantiacum* (Simon) 1897. Um especimen de Ouro Prêto etiquetado como *"Hapalopus* sp" é redescrito sob o nome de *Cyclosternum melloleitaoi* n. sp.

O gênero *Dolichothele* M. L. 1923, com a espécie típica *D. exilis* M. L. 1923 deve ser enquadrado sob *ISCHNOCOLINAE* e não *BARYCHELIDAE*. Também o especimen etiquetado como *"Leptopelma nigrioculatum"* pertence a *ISCHNOCOLINAE*. *Cyrthopholis zorodes* M. L. 1923 é espécie boa. *Ischnocolus parvus* Keyserling 1877 parece-nos espécie sul-americana boa. São válidas igualmente *Pseudhomoeomma fasciatum* M. L. 1930 e Tmesi-*phantes montanus* M. L. 1923.

SELENOSCOMIINAE: Ephebopus violaceus M. L. 1930 não pôde ser reidentificado pelo mau estado de conservação; tem a mesma procedência de *Avicularia cuminami.*

BARYCHELIDAE, DIPLOTHELINAE — *Neodiplothele fluminense* M. L. 1924 é espécie boa, da qual é sinônimo *Trichopelma annulatum* M. L. 1943 do mesmo local típico; *Neodiplothele leonardoi* M. L. 1940 é fêmea jovem, ainda sem receptáculos seminais.

LEPTOPELMATINAE: dois exemplares sem etiquêta, macho e fêmea, do bairro da Tijuca, Rio. São descritos como *Neostothis melloleitaoi* n. sp.; *Psalistopoides fulvimanus* M. L. 1934 é sinônimo de *Neostothis gigas* Vellard 1925.

UNITERMOS: Aranhas Caranguejeiras; Revisão de tipos.

INTRODUÇÃO

No presente trabalho reestudamos alguns tipos de aranhas caranguejeiras e outro importante material, estabelecidos por C. de Mello Leitão e depositados na Coleção Aracnológica do Museu Nacional do Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODO

Foi reestudado o seguinte material:

CTENIZIDAE, ACTINOPODINAE,

Actinopus rufibarbis M. L. 1930, tipo fêmea, Rio Cuminá;
A. niger — etiquetado por M. L. com êste nome, mas provàvelmente não publicado, macho, Pedras Altas, Rio Grande do Sul;
A. paranensis M. L. 1923 — tipo, macho, Paraná (sem localidade) Hermes Lima leg.

SciELO

BÜCHERL, W.; T. COSTA, A. e LUCAS, S. — Revisão de alguns tipos de aranhas caranguejeiras (*ORTHOGNATHA*) estabelecidos por C. de Mello Leitão e depositados no Museu Nacional do Rio. *Mem. Inst. Butantan*, 35: 117-138, 1971.

CTENIZINAE,

Idiops anomalus — etiquetado por M. L. sob êste nome, mas provàvelmente não publicado — fêmea, jovem, rio Jaminauá;
I. crulsi — M. L. 1930 — tipo, fêmea, rio Cuminá, Pará;
I. nilopolensis — M. L. 1923 — tipo, fêmea, Nilopolis, Est. do Rio; Blanc de Freitas leg.

DIPLURIDAE, DIPLURINAE,

Diplura bitaeniata M. L. 1941 — tipo, fêmea jovem, Bogotá, Colômbia;
D. borgmieri M. L. 1924 — tipo, fêmea e 2 sintipos, fêmeas, Petropólis, Estado do Rio;
D. fallax M. L. 1926 — tipo, fêmea, e sintipo, fêmea, Alto Juruá, Amazonas;
D. nigerrima M. L. 1941 — tipo, fêmea, Bogotá, Colômbia;
D. paulistana M. L. 1924 — tipo, fêmea, Santos, Est. de São Paulo (n.º 55 da col.);
Uruchus costatus — etiquetado por M. L. com êste nome, mas provàvelmente não publicado, 2 fêmeas jovens — Peru (sem localidade);
Harmonicon nigridorsi — M. L. 1924 — tipo, macho, sintipo, fêmea jovem, Rio (n.º 847 da coleção);
Thalerothele aurantiaca M. L. 1943 — tipo, fêmea, Ouro Preto, Est. Minas Gerais (n.º 53 945);
Th. sanguinea (F. Cambridge) 1896 fêmea, Pará;
Th. uniformis M. L. 1923 — macho, Ouro Preto, Minas Gerais. O especimen está etiquetado por M. L. como tipo, embora o autor, ao descrever a espécie, tenha publicado: Habitat — São Paulo, tipo, macho, no Museu Paulista, E. Garbe leg.

MACROTHELINAE,

Ischnothele sexpunctatum M. L. 1941 — tipo, fêmea, sintipos, 2 fêmeas, Bogotá, Colômbia;
I. zoroda M. L. 1943 — tipo, fêmea, Veadeiros, Est. de Goiás.

THERAPHOSIDAE, THERAPHOSINAE,

Phormictopus multicuspidatus M. L. 1929 — tipo, macho, Tapera, Pernambuco.

GRAMMOSTOLINAE,

Pterinopelma vellutinum M. L. 1923 — Tipo, macho, São Paulo;
Pt. dubium M. L. 1923 — tipo, macho, Capital de São Paulo; n.º 48 da coleção. O autor, ao descrever esta espécie, parece ter designado um segundo tipo, macho, depositado no Museu Paulista, sob n.º 148, capturado no bairro do Ipiranga, Capital de São Paulo, por H. Lüderwaldt.

ISCHNOCOLINAE,

Aphantopelma venosum M. L. 1936 — tipo, fêmea jovem, Chile (sem localidade), n.º 50234 da coleção;

Cyclosternum schmardae Ausserer 1871 — macho, Colômbia;
C. semiaurantiacum Simon 1897 — 2 fêmeas jovens, Barra do Tapirapé, Mato Grosso;
Cyrtopholis zorodes M. L. 1923 — tipo, fêmea, São Paulo;
Hapalopus sp. — macho, Ouro Preto, Minas Gerais;
Ischnocolus parvus Keyserling 1877 — jovem, Montevideu, Uruguai, n.º 14120 da coleção;
Magulla atrogaster — fêmea, Ceará. Não pudemos verificar se o autor publicou esta espécie;
Pseudhomoeomma fasciatum M. L. 1930 — tipo, macho, rio Cuminá, Pará; sintipos, fêmea e fêmea jovem;
Tmesiphantes montanus M. L. 1923 — tipo, macho, e sintipo, fêmea, Retiro do Ramos, Itatiaia, Est. do Rio; Carlos Moreira leg.
Cyriocosmus semifasciatus M. L. 1939 — fêmea, Ilha Otomana, Venezuela.

AVICULARIINAE,

Avicularia cuminami M. L. 1930 — tipo, fêmea jovem, Rio Cuminá, Pará;
A. palmicola M. L. 1945 — tipo, fêmea, Mumbaba, Paraíba;
A. pulchra M. L. 1933 — tipo, fêmea jovem, Tapera, Pernambuco.

SELENOCOSMIINAE,

Ephebopus violaceus M. L. 1930 — tipo, fêmea, rio Cuminá, Pará.

BARYCHELIDAE, DIPLOTHELINAE,

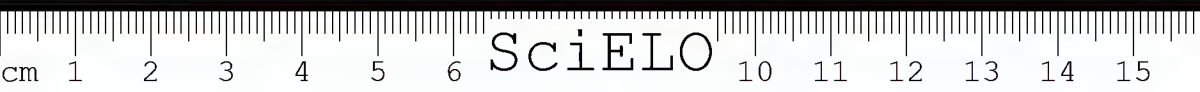
Neodiplothele fluminense M. L. 1924 — tipo, macho, Niteroi, Est. do Rio;
N. leonardosi M. L. 1940 — tipo, fêmea jovem, Paraguassu, Estado da *Bahia.*

LEPTOPELMATINAE

Sem etiqueta que designasse nome científico; macho e fêmea, bairro da Tijuca, cidade do Rio;
Dolichothele exilis M. L. 1923, tipo, fêmea, sintipo, fêmea, Paraíba do Norte; Tranquilino Leitão leg.;
Leptopelma nigrioculata — macho, Alto Tocantins, Goiás; ao que parece, não publicada pelo autor.
Trichopelma annulatum M. L. 1943 — tipo, macho, bairro de Copacabana, cidade do Rio de Janeiro; (n.º 58299 da coleção).

Os nomes que referimos nesta lista achavam-se nas etiquêtas. No presente reestudo procuramos aferir alguns caracteres não mencionados por Mello Leitão, como: receptáculos seminais, bulbos, escópulas nos metatarsos, espinulação nos metatarsos, apófises nas tíbias do primeiro par de patas em machos, medidas do comprimento das fiandeiras; bem como os desenhos que publicamos, elucidam melhor algumas das espécies descritas por aquêle autor.

REESTUDO DO MATERIAL

Actinopus rufibarbis — As garras superiores têm apenas um dente grande, situado no têrço basal. (Fig. 1).

Actinopus niger — Tíbias do primeiro par de pernas sem apófise; todos os tarsos escopulados até a base; garras superiores com um só dente; bulbo periforme, com duas saliências na base do êmbolo, levemente retorcido, de ponta adelgaçada e em ângulo de cêrca de 120 graus em relação ao eixo do bulbo (Fig. 2); rastelo das quelíceras colocado sôbre uma apófise saliente, com muitos espinhos curtos e robustos, sendo os do canto interno os mais longos. Deve tratar-se, provàvelmente, do macho de *A. crassipes* (Keyserling) 1891, espécie descrita de Taquara, Rio Grande do Sul.

Actinopus paranensis — Patela do terceiro par de patas com espinhos curtos, robustos, dispostos em várias fileiras (Fig. 3); garras superiores com um só dente; bulbo e êmbolo como na Fig. 4.

Idiops anomalus — O tubérculo ocular frontal é fortemente bilobado; lábio com 3 cúspides; esterno com 4 cm de comprimento por 3 cm de largura. Todo o resto é igual à descrição de *I. petitii* (Guérin) 1838, de Santarém, Pará, com a qual julgamos êste especimen idêntico.

Idiops crulsi — Receptáculos seminais (Fig. 5) formando dois tubos divergentes em forma de "S", afastados entre si o seu comprimento.

Idiops nilopolensis — Esterno 4,5 cm de compr. por 4,0 cm de largura; receptáculos seminais representados pela Fig. 6; garras superiores com 1 dente sub-mediano grande e abaixo dêle um bem menor. (Fig. 7).

Diplura bitaeniata — Esterno quase circular; último par de sigilas marginal; sulco ungueal com 9 dentes, aproximadamente do mesmo tamanho e equidistantes; garras superiores pectinadas em duas séries, aproximando-se as séries na base (Fig. 8); o espécimen ainda não apresenta receptáculos seminais, de maneira que será difícil justificar sua separação de *D. aequatorialis* ou *longicauda*, descritas por Ausserer em 1871 ou ainda de *D. cousini* Sim. 1888, as três do norte do Equador.

Diplura borgmeieri — No espécimen maior o abdomen tem 10,5 mm e a fiandeira superior de 8,9 mm (2,5 — 2,6 — 3,8); num segundo exemplar, menor, o abdomen mede 9,0 mm e a fiandeira superior também 9,0 mm. Isto mostra que as duas medidas têm valor secundário apenas na especificação. Lábio subquadrado, mais largo que longo, sem cúspides; ancas dos palpos sem cúspides; sulco ungueal das quelíceras com 12 a 14 dentes, os 4-6 apicais maiores, os basais menores, alternando-se um grande com um pequeno; cômoro ocular cêrca de duas e meia a três vêzes mais largo que longo; 1.ª fila ocular pouco procurva, passando uma reta tangente à borda anterior dos M.A. no 1.º quinto dos L.A.; M.A. maiores que L.A.; êstes pouco maiores que L.P. e quase contíguos a êles; fóvea pequena, oval; metatarso I e II com 3 pares de espinhos ventrais e mais 1 ou 2 na face interna; metatarsos III e IV com numerosos espinhos; por baixo da sutura do lábio há 2 impressões laterais grandes, glabras, que não devem ser confundidas com sigilas; sigilas anteriores pequenas, separadasdas margens menos de seu diâmetro, segundo par maior, afastado da margem também menos de seu diâmetro; terceiro par o maior afastado da margem cêrca de meio diametro. As três fêmeas são jovens, duas sem receptáculos, a terceira com receptáculo rudimentar. Deve-se relacionar esta espécie com *D. gymnognatha* Bertkau 1880, descrita de Pedra Açu, Est. do Rio, perto de Petrópolis.

Diplura fallax = *Uruchus fallax* (Mello Leitão) 1926 — Tarsos anteriores com escópula inteira, não dividida; as escópulas dos tarsos III e IV divididas por fileiras medianas de cerdas; cômoro ocular quase frontal; todos os tarsos flexuosos, com a porção basal mais espessa que a apical e parecendo pseudo-articulados (Fig. 9); tarsos do palpo escopulados até a base, nas faces ventral e lateral, tarsos III e IV com escópulas distais apenas na face ventral, mas quase até a base nos lados anterior e posterior; metatarsos I e II escopulados quase até a base, III até a metade, IV sem escópula. Receptáculos seminais (Fig. 10) ramificados no ápice, cada ramo com seu duto, que se une ao duto principal.

Diplura nigerrima — Valem também as considerações feitas em tôrno de *D. bitaeniata*, que é da mesma procedência. Abdomen 25 mm; fiandeira superior 24 mm (6 — 7 — 11 mm); metatarsos I e II com 2 espinhos apicais, 2 ventrais submedianos e 2 laterais; sulco ungueal com 13 dentes grandes, os apicais maiores, os inferiores alternando-se um grande com outro menor (como em *D. borgmeieri*); receptáculos seminais como na espécie seguinte, mas ainda não tão evoluidos.

Diplura paulistana — Receptáculos seminais com 2 bôlsas num e 3 no outro lado, de dutos retorcidos (Fig. 11).

Uruchus costatus — No tarso I a escópula é indivisa, embora existam na metade basal, ventral, algumas cerdinhas delicadas, quase invisíveis, que não dividem a escópula; cômoro ocular frontal, distante da margem anterior apenas um diâmetro dos olhos L.A.; nenhum especimén apresenta receptáculos seminais, razão porque julgamos que seria melhor enquadrar êstes espécimens sob *Uruchus jelskii* (F. Cambridge) 1896, descrita também do Peru.

Harmonicon nigridorsi (TRECHONINI) — com aparelho estridulante; abdomen 10 mm, fiandeira superior 10,8 mm (3,5 — 3,6 — 3,7 mm); bulbo copulador (Fig. 15) em forma de cebola, êmbolo cêrca de três vêzes mais longo que o bulbo, quase reto, mas com ponta curva; ápice da tíbia I do macho (Fig. 16) com pequena apófise ventral externa, com robusto e longo espinho recurvo; o metatarso dobra-se do lado interno desta apófise e apresenta na face sub-basal externa uma saliência romba, que, ao dobrar-se o articulo, vem de encontro ao esporão tibial.

Thalerothele aurantiaca — (TRECHONINI) — Escópulas dos metatarsos e tarsos como em *Diplura* ou em *Harmonicon;* fiandeiras posteriores mais curtas que o abdomen, o artículo apical mais longo que o médio; abdomen 7 mm, fiandeiras 5,8 mm (1,8 — 1,9 — 2,1 mm); lira com 7 cerdas; receptáculos seminais (Fig. 12) formando duas vesículas subredondas, seu duto um pouco mais longo que seu diâmetro. É a fêmea de *Th. uniformis* M. L. 1923.

Thalerothele sanguinea — (F. Cambridge) — A fiandeira superior do espécimen mede 7,1 mm (2,4 mm — 2,2 mm — 2,5 mm); em volta da carapaça céfalo-torácica há cerdas claras, enfileiradas, com pontas curvas para a frente, longas e eqüidistantes; seus receptáculos seminais obedecem à conformação da espécie precedente, mas se distingue desta por seus dutos muito mais curtos que o diâmetro longitudinal da vesícula. Pelo confronto do espécimen com a descrição de *Th. fasciata* Bertkau 1880, impõe-se a convicção de pertencer o

mesmo a esta espécie, a qual ocorre na Venezuela e no norte amazônico do Brasil. *Th. annectens* (Bertkau) 1880, *fasciata* e *sanguinea*, três espécies do norte do Brasil, cada uma conhecida apenas pelo exemplar típico, fêmea. Talvez formem um só grupo.

Thalerothele uniformis — Escópulas tarsais ralas (trata-se de um macho); tarsos flexuosos, pseudo-articulados; bulbo copulador (Fig. 13) em forma de cebola, êmbolo pouco curvo, de ponta aguda, pouco mais longo que o eixo longitudinal do bulbo. Tíbia I do macho com pequena apófise quase apical, munida de robusto espinho quase reto (Fig. 14). Em 1926 Mello Leitão descreveu mais outro macho, de Ouro Preto, sob o nome específico de *Th. minensis*, que apresentaria apenas diferenças individuais, principalmente no tocante ao número de cerdas da lira. Mas em trabalho posterior, o autor destituiu de valor específico as variações dos pêlos das liras nesta subfamília. Em vista disso *Th. minesis* M. L. 1923 deverá chamar-se *Th. uniformis* M. L. 1923 e como local do tipo deve prevalecer o da etiqueta do exemplar do Museu Nacional que é Ouro Preto, Estado de Minas Gerais.

Ischnothele sexpunctatum (*MACROTHELINAE*) — Garra superior do primeiro par de pernas com 8 a 9 dentes, os apicais os mais longos, decrescendo em tamanho em direção à base (Fig. 17, à direita); garra do quarto par com 4 a 5 dentes (Fig. 17, à esquerda); a inserção dos dentes é em linha de um "S". Receptáculos seminais (Fig. 18) com bôlsas ovais, seus dutos convergentes mais estreitos no colo; esterno esférico com as sigilas posteriores marginais. Lábio cêrca de três vêzes mais largo que longo, sem cuspides. Ancas dos palpos, entretanto, muito cuspulosas. Sulco ungueal das quelíceras com duas fileiras de dentes, a interna com 5 a 6, a externa com 7 a 12.

Ischnothele zoroda — Garras do primeiro par de pernas com 8 a 9 dentes, os apicais maiores, o quarto par com 5 dentes, os dois apicais os menores; sua inserção é em forma de "S" (Fig. 19). O artículo terminal das fiandeiras superiores é tão longo quanto os dois precedentes juntos; fiandeiras inferiores afastadas entre si, na base, cêrca de 4 vêzes o diâmetro de seu artículo basal. Lábio duas vêzes mais largo que longo, com 2 cúspides minúsculas, localizadas submarginalmente; lábio avermelhado, mas a margem anterior amarela. Ancas dos palpos com numerosas cúspides. Receptáculos seminais (Fig. 20) em dois pares de cada lado, vesiculares, com 4 dutos independentes, envoltos em membranas.

Phormictopus multicuspidatus — A espécie descrita sob êste nome deverá chamar-se *Cyclosternum multicuspidatum* (M.L.) 1929 (*THERAPHOSIDAE, ISCHNOCOLINAE*), com os seguintes caracteres, não mencionados pelo autor: Tarso IV (Fig. 21) com a escópula nìtidamente dividida na metade basal por fileiras de cerdas curtas, rígidas; as escópulas dos outros tarsos inteiras. Sem aparelho estridulante; sigilas posteriores pequenas e marginais; trocanter dos palpos na face posterior com pêlos plumosos, densíssimos e eretos; face anterior das coxas do primeiro par de pernas veludosa; fóvea torácica levemente recurva; lábio sub-quadrado, com muitas cúspides. Tíbia I do macho (Fig. 22) com 2 apófises, a ventral inferior maior, alongada, com 1 pequeno espinho no tôpo e mais outro, longo, do lado; a lateral, interna, menor, de ponta curva e romba, com um espinho apical por dentro, recurvado por cima da ponta. O metatarso dobra-se ao lado da apófise maior. Tíbia do palpo do macho (Fig. 23) com robusto rastelo apical e mais 2

a 3 espinhos sub-medianos. Bulbo sub-esférico (Fig. 24), com profunda fenda na base do êmbolo; êste um nada mais longo que o bulbo, de ponta chanfrada. Metatarso I com 1 espinho apical mediano ventral e mais 1 ventral sub-basal; II com 3 apicais e 1 sub-basal; III com 4 apicais e 4 medianos; IV muito espinhoso.

Pterinopelma vellutinum, Pt. dubium (*GRAMMOSTOLINAE*): apresentam o lábio um pouco mais longo que largo. O autor atribuíra erroneamente a *dubium* um lábio mais largo que longo, salvo êrro de impressão. Em 1923 Mello Leitão descreveu mais uma terceira espécie, *Pt. wacketi,* usando como tipo também um macho (Museu Paulista n.º 147), capturado em Raiz da Serra, baixada santista, Estado de São Paulo. Teríamos, assim, três espécies, conhecidas apenas por 3 machos, tôdas da área Capital de São Paulo, Serra do Mar. Certamente deverão formar uma só espécie, para a qual deverá prevalecer, por prioridade de página, o nome de *Pt. wacketi* M. L. 1923.

Aphantopelma venosum — (*ISCHNOCOLINAE*) — Lábio mais largo que longo, com 2 cúspides. Sigilas posteriores pequenas, afastadas das margens menos de seu diâmetro; fóvea torácica sub-reta; tarsos I, II e III escopulados até a base, e com escópulas indivisas, tarso IV (Fig. 25) também escopulado até a base, porém a escópula dividida por faixa longitudinal estreita de cerdas; metatarso I escopulado até a base, II em mais da metade, III com pequena escópula apical, IV sem escópula; metatarsos I e II com apenas 1 espinho sub-basal, III e IV com cêrca de 8 espinhos; tíbia I sem espinho, II com um apical, III com dois apicais, dois anteriores e mais dois posteriores, IV com três apicais e 1 par anterior e posterior; patelas e fêmures inermes. Garras superiores com 2 séries de dentes (com 7 externos e 9 internos na IV); sulco ungueal com 8 dentes, mais ou menos equidistantes e do mesmo tamanho. O exemplar ainda estava sem receptáculos.

Cyclosternum schmardae — Tíbia do palpo do macho (Fig. 26) com rastelo, restrito à área apical interna, formado por cêrca de 9 espinhos em três filas, face externa com pequena apófise sub-apical. Bulbo (Fig. 27) com conformação semelhante ao de *multicuspidatum,* porém, com constricção leve no meio, êmbolo mais curto e ponteagudo.Apófises da tíbia I como em *multicuspidatum,* a menor, porém, não apresenta espinho interno no tôpo, mas 1 lateral; metatarso I com 2 espinhos apicais pequenos e 1 sub-basal, II com 3 apicais e 1 sub-basal. Fiandeiras superiores com artículo basal mais longo que o médio, o apical mais longo que o basal. O espécimen representa o 1.º macho descrito da espécie. Como o tipo de Ausserer era do Equador e êste macho é da Colômbia, não se pode ter muita certeza sôbre a co-especificidade dos dois exemplares.

Cyclosternum semiaurantiacum — Escópula do tarso II com algumas cerdas pequenas, delicadas, e mfilas longitudinais, quase invisíveis e que não dividem a escópula. O espécimen é jovem, ainda sem receptáculos e segundo Schiapelli e Gerschman de Pipelin é *Ceropelma semiaurantiacum* (Simon) 1897.

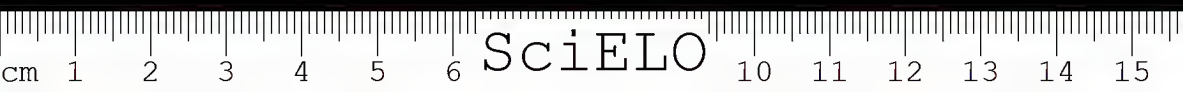
Cyrtopholis zorodes — Área ocular paralela. Último par de sigilas afastado da margem um pouco mais de seu diâmetro; lábio sub-quadrado, com muitas cúspides; escópulas dos tarsos I e II indivisas, III e IV divididas por estreita faixa de cerdas; metatarsos I e II escopulados até a base; a lira do aparelho estridulante está na face posterior dos trocânteres dos palpos e os pinos percussores, na face anterior dos trocânters do primeiro par de pernas. Receptáculos seminais (Fig. 28) em forma de duas cúpulas, próximas na base.

BÜCHERL, W.; T. COSTA, A. e LUCAS, S. — Revisão de alguns tipos de aranhas caranguejeiras (*ORTHOGNATHA*) estabelecidos por C. de Mello Leitão e depositados no Museu Nacional do Rio. *Mem. Inst. Butantan,* 35: 117-138, 1971.

Hapalopus sp. — O espécimen etiquetado sob êste nome pertence ao gênero *Cyclosternum*. Tíbia I do macho (Fig. 29) semelhante à de *multicuspidatum* ou *schmardae,* como também a flexão do metatarso, apenas a apófise inferior, maior, não apresenta espinho lateral, mas um apical. Tíbia do palpo do macho (Fig 30) com rastelo apical interno, formado de quatro dentes (2 apicais e 2 sub-apicais); face externa da tíbia I lisa; bulbo (Fig. 31) do tipo de *Cyclosternum,* próximo ao de *multicuspidatum,* mas com variações específicas, como se infere da comparação com as Figs. 24 e 27. Como se trata do primeiro espécimen de Ouro Preto, Minas, de onde não se conhecem representantes dêste gênero, consideramos o exemplar como tipo de nova espécie, à qual demos o nome de *Cyclosternum melloleitaoi* n. sp., em homenagem ao autor. Tipo do Museu Nacional do Rio.

Ischnocolus parvus — Embora Petrunkevitch no Index-Catalogue, Bull. A. M. Nat. Hist. 29, à pág. 74, 1911, tenha pôsto em dúvida a existência na América de representantes do gênero *Ischnocolus,* contudo, a descrição dêsse exemplar coincide com a chave que Simon estabeleceu para êste gênero. O espécimen apresenta: área ocular retangular, sigilas posteriores afastadas das margens um pouco menos de seu diâmetro, fóvea torácica levemente procurva, lábio sub-quadrado, com numerosas cúspides, tarsos IV com escópula dividida por faixa ventral de cerdas, que não ocupam mais que um têrço da largura do tarso; I e II também com escópulas divididas, embora em I as cerdas sejam minúsculas e pouco nítidas. Além dêsses caracteres genéricos apresenta: tarsos I e II nitidamente mais longos que os metatarsos; tarsos III pouco mais longo que o metatarso; tarso IV pouco mais curto que o metatarso; metatarsos I e II com espinho um apical, III com 3 apicais; I e II escopulados até a base, III até a metade; IV apenas com escópula apical. Garras com apenas um dentículo mediano. Como o local de captura dêste espécimen coincide com o local do tipo da espécie, confirmamos a espécie *I. parvus* Keyserling 1877, para o Uruguai. Garras superiores (Fig. 32).

Magulla atrogaster = *Cyclosternum multicuspidatum* (M. L.) 1929 — Tarso I com escópula indivisa, II com cerdas divisórias delicadíssimas, III com cerdas mais robustas, dispostas em faixa divisória mais estreita na base, alargando-se em leque em direção apical, IV com faixa estreita, completa, de cerdas divisórias. Tíbia do palpo com 3 espinhos apicais e 3 mediais; tíbias I e II com 2 espinhos ventrais apicais e 1 mediano; metatarso I com 1 espinho apical e 2 sub-basais, II com 3 apicais e 2 sub-basais, I e II escopulados até a base, III menos da metade apical, IV apenas apicalmente; mais longos que os tarsos; garra I-IV com apenas 3 dentes, pequenos, iguais e equidistantes (Fig. 33). Receptáculos seminais (Fig. 34) com aspecto de pequenas vesículas, de duto curto convergente na base e distantes um do outro mais de seu comprimento. Escópulas, espinulação e local de captura coincidem com *C. multicuspidatum.*

Pseudhomoeomma fasciatum — Metatarsos I e II, em macho e fêmeas, com escópulas na metade apical, III no têrço apical e IV no quarto apical. Escópulas nos tarsos I e II, na fêmea, divididas por poucas cerdas, mas nítidas (Fig. 35, à esquerda), em IV formam uma faixa bastante larga (Fig. 35, à direita); no macho as cerdas divisórias são mais delicadas e formam, no IV, faixa mais estreita (Fig. 36). Metatarso I, em macho e fêmea, com 1 espinho apical, II com 1 apical e 1 sub-basal. Garras dos tarsos sem dentes em macho e fêmea;

esterno quase esférico, sigilas posteriores minúsculas, quase marginais; lábio quadrado, tão longo quanto largo, com muitas cúspides; fiandeiras superiores do macho com artículo apical mais longo que o basal, o médio um nada mais curto que o basal; na fêmea, médio e basal do mesmo comprimento e apical um pouco mais longo; sulco ungueal com 7 dentes, eqüidistantes e do mesmo tamanho. Tíbia I do macho, como foi descrita por Mello Leitão; bulbo longo, periforme, com êmbolo curvo, ponteagudo e mais uma apófise, à guiza de uma "guia", bem saliente, paralela ao êmbolo (Fig. 37-A). Receptáculos seminais (Fig. 37-B) vesiculares, com dutos curtos, alargados na base, enovelados, com recurvo lateral.

Tmesiphantes montanus — Sigilas posteriores afastadas das margens quase duas vêzes o seu diâmetro longitudinal; fóvea procurva; lábio com numerosas cúspides; escópula do tarso IV dividida por faixa ventral de cerdas, que ocupa tôda a largura do artículo; fiandeiras com os artículos basal e apical equilongos, o mediano pouco mais curto; tíbia do palpo do macho (Fig. 38) com 2 acúleos robustos no canto apical interno; bulbo (Fig. 39) com êmbolo recurvo quase em ângulo reto, com ponta aguda; tíbia I (Fig. 40) com 2 apófises, a maior, ventral, curva com um espinho no ápice, a menor de ponta romba, com 1 acúleo do lado. Receptáculos seminais (Fig. 41) afastados entre si e unidos na base. Metatarsos I e II escopulados até a metade ou menos, III apenas apicalmente, IV apicalmente na fêmea, sem escópula no macho; metatarso I com 1 a 3 espinhos apicais, II com 3 a 4 apicais e mais alguns inferiores.

Cyriocosmus semifasciatus = *Chaetorrhombus semifasciatus*. (Mello Leitão) 1939 — Metatarsos I e II mais curtos que os tarsos, III com escópula apical, com 4 espinhos apicais e mais 4 ventrais, IV sem escópula (há um vestígio, demarcado por pelinhos delicados); fiandeiras superiores com artículos: o basal mais longo que o médio, êste tão longo ou pouco mais curto que o apical. Sulco ungueal com 6 a 7 dentes, eqüidistantes e do mesmo tamanho. Garras I e II sem dentes. Receptáculos seminais (Fig. 43) vesiculares, com duto longo, delgado, sinuoso, serpentiniforme. Tarso I com escópula dividida por estreita faixa de cerdas, IV com cerdas ocupando tôda a largura do artículo (Fig. 42); metatarsos I e II escopulados quase até a base, com 1 acúleo apical e 1 sub-basal; área ocular retangular, sigilas posteriores marginais, fóvea levemente procurva; lábio sub-quadrado, com muitas cúspides. Muito próxima de *Chaetorrhombus kochi* Ausserer 1871, cujo local típico também é a Venezuela.

Avicularia cuminami — O espécimen ainda não apresenta receptáculos seminais e encontra-se em péssimo estado de conservação.

Avicularia palmicola — A Fig. 44 representa os receptáculos seminais. Parece que o espécimen é ainda jovem.

Avicularia pulchra — Espécimen jovem, ainda sem receptáculos.

Ephebopus violaceus — Pelo mau estado de conservação em que se encontra o espécimen, não conseguimos, nem mesmo, estabelecer se existe ou não e onde estaria localizado o aparelho estridulador.

Neodiplothele fluminense — (*BARYCHELIDAE, DIPLOTHELINAE*) — com um só par de fiandeiras, cujo artículo basal é pouco mais longo que largo, e o médio e distal são anuliformes (Fig. 45). Rastelo das quelíceras (Fig. 46) formado por 3 espinhos robustos, rombos, sem estarem sôbre uma saliência. Bulbo (Fig. 47) oblongo, êmbolo ponteagudo. Lábio cêrca de cinco vêzes mais largo que longo, laminar (Fig. 48) e ancas dos palpos com 3 cúspides grandes cilíndricas. Garras sem dentes (Fig. 49). Ápice da tíbia I com 2 robustos espinhos apicais internos (não externos) se mestarem sôbre apófises e mais 1, menos robusto, apical externo. Esterno mais longo que largo; sigilas invisíveis. Tarsos I e II curvos, III e IV quase direitos. Há uma terceira garra rudimentar. É o primeiro e único macho do gênero *Neodiplothele* M. L. 1917.

Neodiplothele leonardoi — Tarsos retos. Rastelo das quelíceras com cêrca de 6 espinhos e robustas cerdas. Sulco ungueal com 7 dentes. O exemplar é uma fêmea jovem, ainda sem receptáculos seminais.

Sem etiqueta (*BARYCHELIDAE, LEPTOPELMATINAE*) *Neostothis melloleitaoi* n. sp. (Em homenagem a Mello Leitão, em cuja coleção se encontravam os dois exemplares); macho e fêmea jovem; localidade tipo: à beira de um caminho nas matas da Tijuca, cidade do Rio de Janeiro, Guanabara: 4 fiandeiras, o artículo distal da superior, na fêmea, mais curto que o médio, no macho os dois equi-longos; quelíceras com rastelo; cômoro ocular cêrca de uma vez e meia mais largo que longo, de posição quase frontal, os L. A. separados entre si menos de seu diâmetro; rastelo sub-espiniforme; lábio mútico, mais longo que longo; ancas dos palpos com numerosas cúspides; tarsos I e II com escópulas indivisas, III e IV com faixas de cerdas divisórias, ocupando área mais larga no IV e na fêmea; garras com dentes em 2 filas; tíbia do palpo do macho (Fig. 50) com uma fila lateral de cerdas e outra (do outro lado) de cerdinhas mais delicadas; em direção ao ápice espículas curtas e no ápice com dois espinhos; tíbia I do macho (Fig. 51) sem apófise, mais 2 espinhos, o ventral, externo, mais robusto e curvo, o ventral interno mais delicado e reto. Fêmea ainda sem receptáculos seminais. A espécie distingue-se de *Psalistops* Simon 1889 pelas escópulas dos tarsos III e IV divididas.

Pela comparação de *Neostothis melloleitaoi* n. sp. com *N. gigas* Vellard 1925, do Alto da Serra, Ana Dias e raiz da Serra, Estado de São Paulo, vimos justificada a nova espécie. Por outro lado estamos convencidos que o gênero *Psalistopoides* M. L. 1934 com sua espécie típica *Ps. fulvimanus* M. L. 1934 são sinônimos de *Neostothis* e da espécie *N. gigas* Vellard 1925, ambos do mesmo local.

Dolichothele exilis — Ao descrever, em 1923, o gênero *Dolichothele* e enquadrá-lo sob *BARYCHELIDAE, LEPTOPELMATINAE*, deu-lhe Mello Leitão os seguintes característicos principais: "Escópulas tarsais anteriores inteiras, as posteriores divididas por uma larga faixa com duas séries de cerdas espiniformes. Fiandeiras superiores delicadas, longas, de segmento médio e apical iguais em comprimento; lábio com dupla fila de 5 cúspides". Examinando o tipo de *D. exilis*, vimos: a) a ausência de um rastelo; b) que as fiandeiras superiores têm o comprimento da metade do abdomen — Abdomen 10,0 mm; fiandeiras 5,1 mm (art. basal: 2,0 — médio 1,2 — apical 1,9 mm). Somando-se a êstes

dois caracteres, ainda, a divisão das escópulas dos tarsos posteriores por fileiras ventrais de cerdas, deve incorporar-se o gênero *Dolichothele* com sua espécie típica *D. exillis* M. L. 1923 sob *THERAPHOSIDAE, ISCHNOCOLINAE*. A Fig 52 representa os receptáculos seminais do tipo, cujos tarsos III e IV apresentam escópula nìtidamente dividida por estreita faixa de cerdas; no ápice do artículo basal das quelíceras há cerdas longas curvas, mas que não devem ser confundidas com um rastelo sub-espiniforme.

Leptopelma nigrioculatum — um espécimen, macho, etiquetado com êste nome, mas não publicado, apresenta, de fato, um conjunto de caracteres que o enquadra sob *ISCHNOCOLINAE, THERAPHOSIDAE*. De resto, as espécies de *Leptopelma* Auss. 1871 são quase tôdas da África. A tíbia I do macho reexaminado não apresenta apófise, mas 2 espinhos robustos, ventrais e mais 5 sub-apicais. A Fig. 53 apresenta a tíbia do palpo e o bulbo copulador. A má conservação não nos permitiu identificar a espécie.

Trichopelma annulatum = *Neodiplothele fluminense* Mello Leitão 1924, com que coincidem o aspecto do bulbo copulador e a tíbia I do macho; fêmea ainda desconhecida.

SUMMARY: Spider-types of the sudorder *ORTHOGNATHA* from the collection in the Museu Nacional, Rio, described by C. de Mello Leitão, have been re-examined.

CTENIZIDAE, ACTINOPODINAE — *Actinopus rufibarbis* M. L. 1930, *A. paranensis* M. L. 1923, and another specimen named by the author, "A. niger" (not published) shurely are the group of *A. crassipes* (Keyserling) 1891.

CTENIZINAE — *Idiops nilopolensis* M. L. 1923 seems to be a good species, but *I. crulsi* M. L. 1930 and another specimen, named by the author, "*I. anomalus*" are synonyms of *I. petitii* (Guérin) 1838.

DIPLURIDAE, DIPLURINAE — *Diplura bitaeniata* M. L. 1941, a young female without receptacula seminalia may be synonym with *D. aequatorialis* Auss. 1871, both from the same geographic region; *D. borgmeieri* M. L. 1924 is synonym with *D. gymnognatha* Bertkau 1880, both from the same region; *D. nigerrima* M. L. 1941, from the same region like *aequatorialis* seems to be only a color-variation of the later; *Harmonicon nigridorsi* M. L. 1924 is a good species. *Thalerothele aurantiaca* M. L. 1943 and *T. minensis* M. L. 1926 are synonyms with *Th. uniformis* M. L. 1923, the three types from the same region; *Th. sanguinea* (F. Cambridge) 1896 belongs to the group of *Th. annectens* (Bertkau) 1880, both from the east Amazonean region. *Diplura fallax* M. L. 1926 is really *Uruchus fallax* (M. L.) 1926; several young females without receptacula seminalia, named by the author "*Uruchus costatus*" not published) really are of the group of *Uruchus jelskii* (F. Cambridge) 1896. *MACROTHELINAE* - *Ischnothele sexpunctatum* M. L. 1941 and *I. zoroda* M. L. 1943 are good species.

THERAPHOSIDAE, AVICULARIINAE — *Avicularia cuminami* M. L. 1930 and *A. pulchra* M. L. 1933 have been established on hand of some young females, without receptacula seminalia; *A.*

palmicola M. L. 1945 is a good species. *GRAMMOSTOLINAE* — *Pterinopelma vellutinum* M. L. 1923, and *Pt. dubium* M. L. 1923 shurely are synonyms with *Pt. wacketi* M. L. 1923. all from the same type-locality.

ISCHNOCOLINAE — *Aphantopelma venosum* M. L. 1936 is a good epecies. *Cyriocosmus semifasciatus* M. L. 1939 is a *Chaetorrhombus semifasciatus* (M. L.) 1939; *Phormictopus multicuspidatus* M. L. 1929 and another specimen, named by the author *"Magulla atrogaster"* (not published) shurely are *Cyclosternum multicuspidatum* (M. L.) 1929; *C. schmardae* Auss. 1871 is a good roeuis and *C. semiaurantiacum* is a *Ceropelma semiaurantiacum* Sim. 1897. One specimen, from Ouro Preto, Minas Gerais, named by the author *"Hapalopus"* sp. is here described as *Cyclosternum melloleitaoi* n. sp.

The genus *Dolichotele* M. L. 1923 with the type species *D. exilis* M. L. 1923, placed by the author under the family *BARYCHELIDAE*, is a *ISCHNOCOLINAE*, with normaly long spinnerets. Another specimen named *"Leptopelma nigrioculatum"* (not published) belongs also to *ISCHNOCOLINAE*. *Cyrtopholis zorodes* M. L. 1923 is a valid species. *Ischnocolus parvus* Keyserling 1877, studied by us with a well preserved specimen, seems to be a South-American species. *Pseudhomoe fasciatum* M. L. 1930 *Tmesiphantes montanus* M. L. 1923 are good species.

SELENOCOSMIINAE — We did not succeed to identify *Ephebopus violaceus* M. L., because the specimen was too badly preserved. It is from the same place like *Avicularia cuminami*.

BARYCHELIDAE, *DIPLOTHELINAE* - *Neodiplothele fluminense* M. L. 1924 is a good species; *Trichopelma annulatum* M. L. 1943 is a synonym *N. fluminense*, both from the same type locality; *Neodiplothele leonardoi* M. L. 1940 is a young female, without receptacula seminalia. *LEPTOPELMATINAE* — We found two specimens, male and female, from Tijuca, Rio; which are *Neotothis melloleitaoi* n. sp. *Psalistopoides fulvimanus* M. L. 1934 is synonym with *Neostothis gigas* Vellard 1925.

UNITERMS: Mygalomorph spiders; Review of the types.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. José Lacerda de Araujo Feio, Diretor do Museu Nacional do Rio de Janeiro, o empréstimo do material reestudado e a Sra. Thereza Sarli, desenhista do Instituto Butantan a confecção dos desenhos.

BUCHERL, W.; T. COSTA, A. e LUCAS, S. — Revisão de alguns tipos de aranhas caranguejeiras (*ORTHOGNATHA*) estabelecidos por C. de Mello Leitão e depositados no Museu Nacional do Rio. *Mem. Inst. Butantan*, 35: 117-138, 1971.

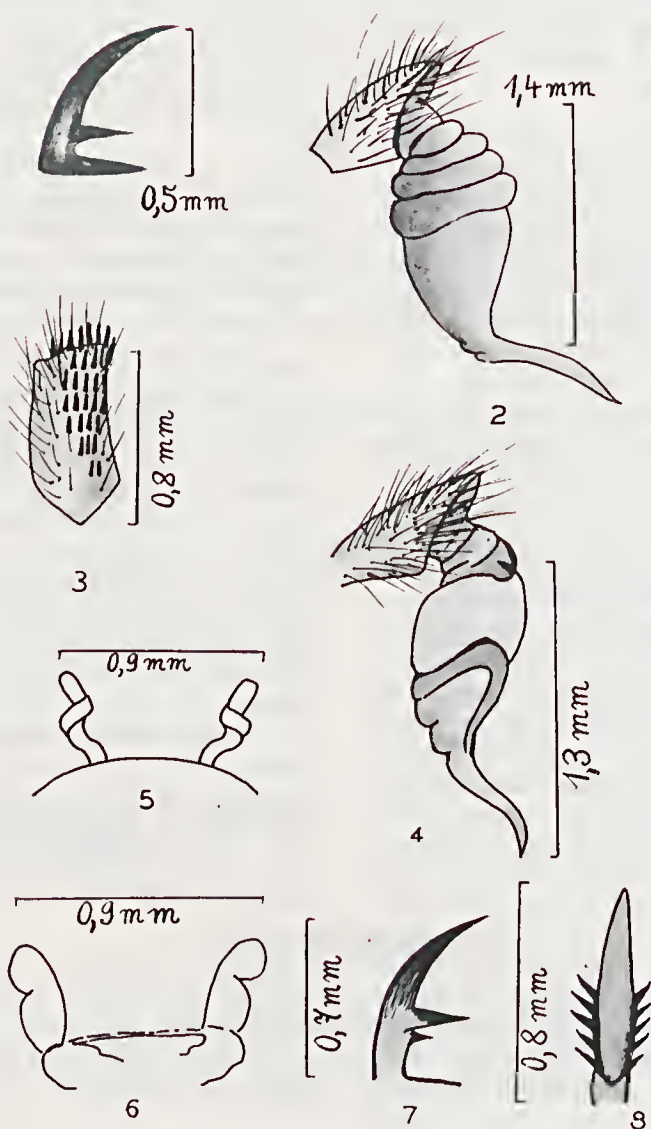
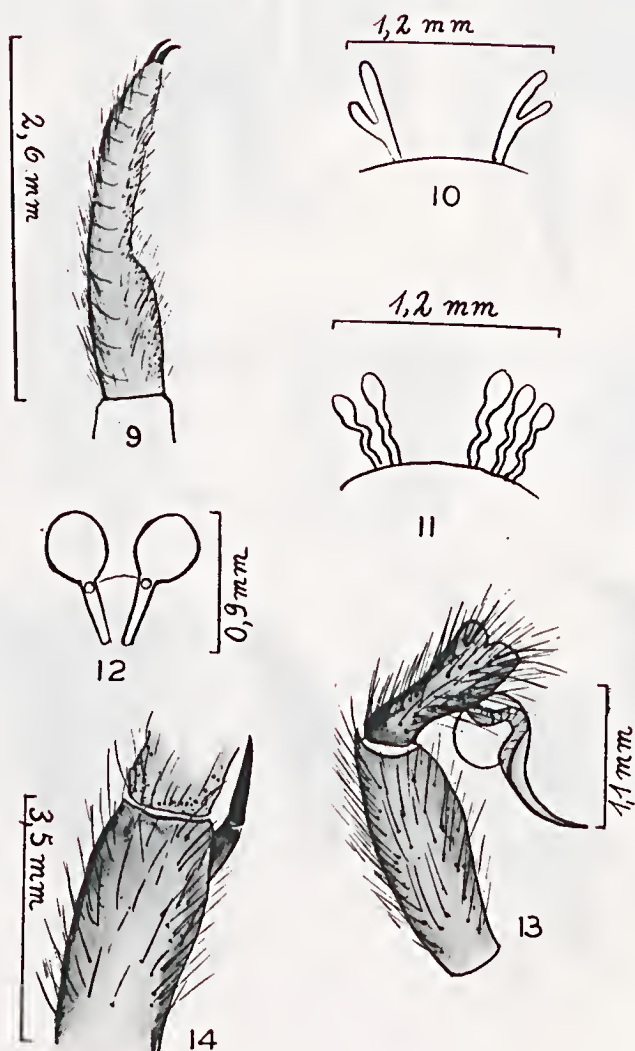
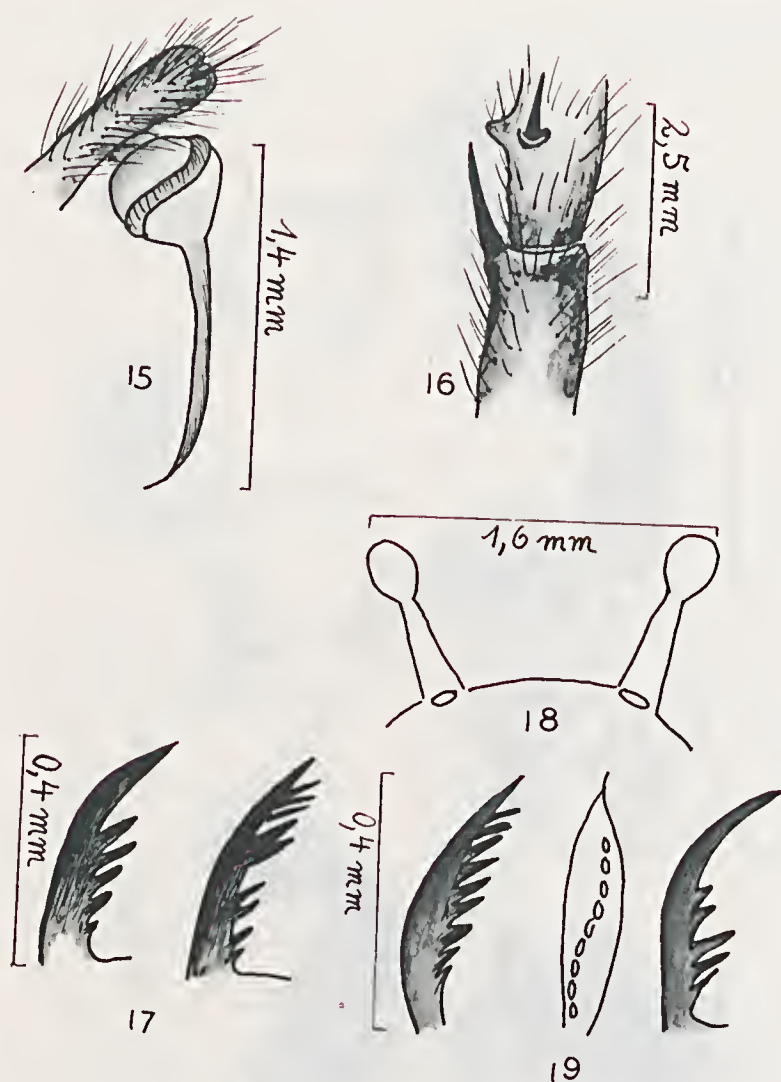



Fig. 1 — *Actinopus rufibarbis*: dente da garra superior;
Fig. 2 — *"Actinopus niger"*: bulbo copulador;
Figs. 3 e 4 — *Actinopus paranensis*: Patela do terceiro par de patas e bulbo copulador (4);
Fig. 5 — *Idiops crulsi*: receptáculos seminais;
Figs. 6 e 7 — *Idiops nilopolensiss*: receptáculos seminais(6) garra superior(7);
Fig. 8 — *Diplura bitaeniatas*: dentição na garra superior;

Figs. 9 e 10 — *Uruchus fallax*: primeiro tarso (9); receptáculos seminais (10);
Fig. 11 — *Diplura paulistana*: receptáculos seminais;
Fig. 12 — *Thalerothele aurantiaca*: receptáculos seminais;
Figs. 13 e 14 — *Thalerothele uniformis*: bulbo copulador (13); apófise da tíbia I;

Figs. 15 e 16 — *Harmonicon nigridorsi* bulbo copulador(15); espinho e apófise na tíbia I e no metatarso I

Figs. 17 e 18 — *Ischnothele sexpunctatum*: dentição das garras I e IV (17); receptáculos seminais(18);

Fig. 19 — *Ischnothele zoroda*: dentição na garra I; inserção dos dentes; dentição da garra IV(19); receptáculos seminais(20);

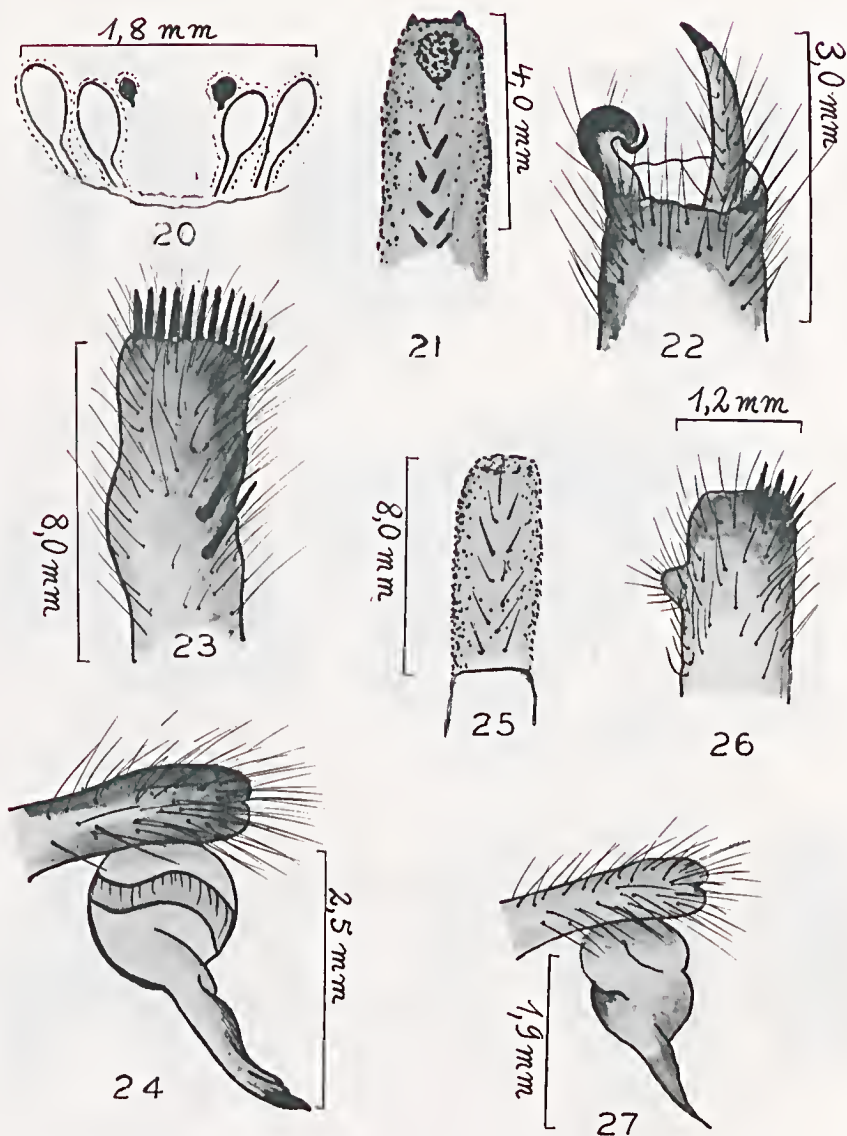



Fig. 20 — *Ischnothele zoroda*: receptáculos seminais;

Figs. 21 a 24 — *Cyclosternum multicuspidatum*: face ventral do tarso IV (21); tíbia I do macho (22); tíbia do palpo do macho (23); bulbo copulador (24);

Fig. 25 — *Aphantopelma venosum*: face ventral do tarso IV;

Figs. 26 e 27 — *Cyclosternum schmardae* — tíbia do palpo do macho (26); bulbo copulador(27)

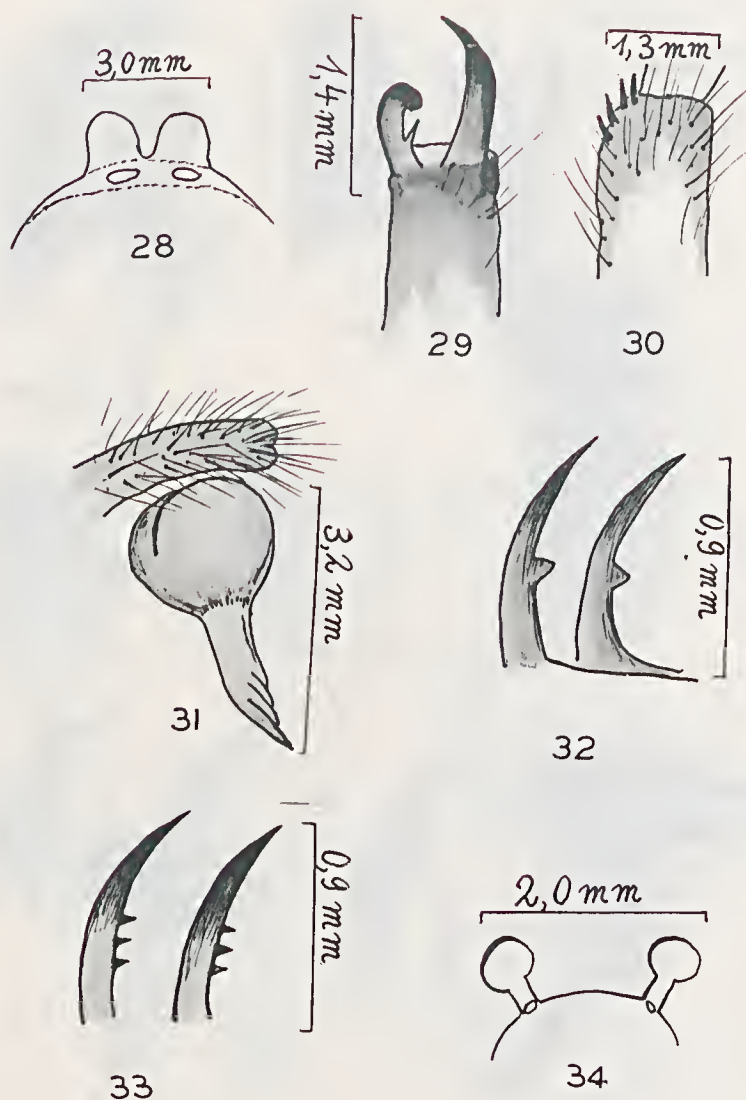
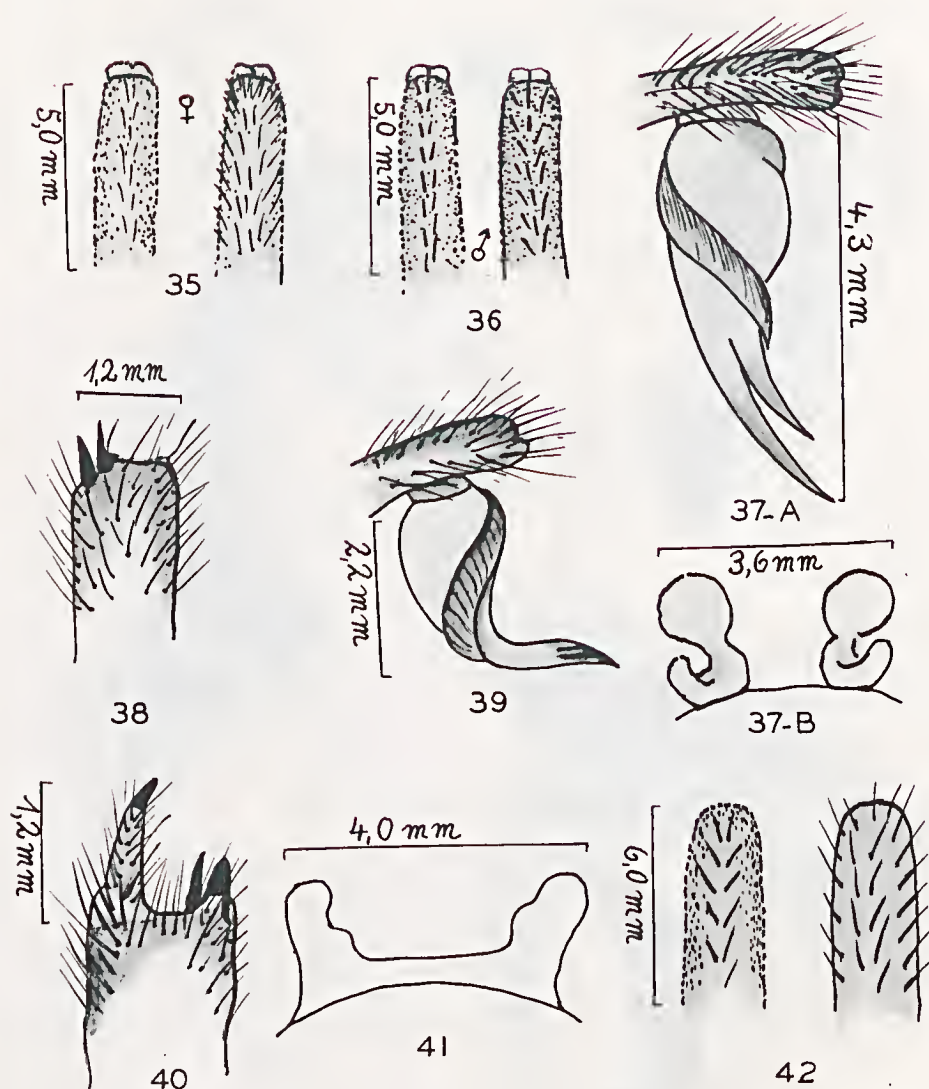



Fig. 28 — *Cyrtopholis zorodes*: receptáculos seminais;

Figs. 29 a 31 — *Cyclosternum melloleitaoi* n. sp.: Tíbia I do macho (29); tíbia do palpo do macho (30); bulbo copulador (31);

Fig. 32 — *Ischnocolus parvus;* dentição das garras I (à esquerda)) e IV (à direita);

Figs. 33 e 34 — *Cyclosternum multicuspidatum*: dentição das garras I (à esquerda) e IV (à direita) (33); receptáculos seminais (34);

Figs. 35 a 37B — B — *Pseudhomoeomma fasciatum*: cerdas divisórias nas escopulas dos tarsos I e IV: em machos (35), em fêmeas (36); bulbo copulador (37-A); receptáculos seminais (37-B);

Figs. 38 a 41 — *Tmesiphantes montanus*: tíbia do palpo do macho (38) bulbo copulador (39); apófises na tíbia I do macho (40); receptáculos seminais (41);

Figs. 42 — *Chaetorrhombus semifasciatus* — cerdas nas escópulas dos tarsos I (esquerda) e IV (direita);

BIBLIOGRAFIA

AUSSERER, A. — *Verh. zool. bot. Ges. Wien.*, **21**, 1871.

BERTKAU, Ph. — *Mem. Cour. Acad. Belg.*, **43**, 1880.

CAMBRIDGE, O. P. — *Proc. Zool. London*, 1896.

KEYSERLING, E. von — *Verh zool. bot. Ges. Wien.*, **27**, 1878.

MELLO LEITÃO, C. — *Rev. Mus. Paulista*, **13**, S. Paulo, 1923.

MELLO LEITÃO, C. — *Ann. Entomol. Soc. France*, **93**, 1924.

MELLO LEITÃO, C. — *Rev. Mus. Paulista*, **14**, 1926

MELLO LEITÃO, C. — *Ann. Acad. Bras. Sci.*, Rio de janeiro, **1**, 1929.

MELLO LEITÃO, C. — *Arch. Mus. Nac. Rio de Janeiro*, **32**, 1930.

MELLO LEITÃO, C. — *Rev. chil. Hist. Nat.*, **37**, 1933.

MELLO LEITÃO, C. — *Mem. Inst. Butantan*, **8**: 403-406, 1934.

MELLO LEITÃO, C. — *Rev. chil. Hist. Nat.*, **40**, 1936.

MELLO LEITÃO, C. — *Rev. suisse Zool.*, **46**, 1939

MELLO LEITÃO, C. — *Ann. Acad. Bras. Sci.*, R. Janeiro, **13** (4), 1941.

MELLO LEITÃO, C. — *Ann. Scad. Bras. Sci.*, R. Janeiro, **15** (3), 1943.

MELLO LEITÃO, C. — *Rev. chil. Hist. Nat.*, **43**, 1946.

MELLO LEITÃO, C. — *Trans. Conn. Acad. Arts. Sci.*, **36**, 1945.

PETRUNKEVITCH, A. — *Trans. Conn. Acad. Sci.*, **33**, 1939.

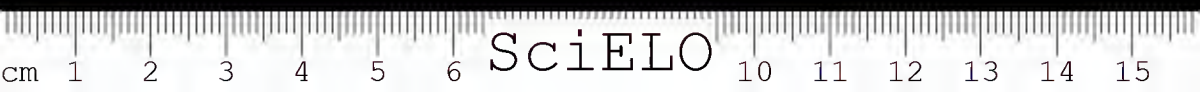
SCHIAPELLI, R. D. and GERSCHMAN DE PIPELIN, B. S. — *Physis*, **30**: 237-238, 1970.

SIMON, E. — *Histoire Natur. des Araign.*, **I**, 1892.

SIMON, E. — *Histoire Natur. des Araign.*, **II**, 1897.

SIMON, E. — *Boll. Mus. anat. comp. Torino*, **12** *(270)*, 1897.

VELLARD, J. — *Mem. Inst. Butantan*, **2**: 82-83, 1925.

Recebido para publicação em 25 de fevereiro de 1970

Mem. Inst. Butantan
35: 139-146, 1971.

THREE CASES OF PARASITISM IN THE MYGALOMORPH SPIDER *LASIODORA KLUGI* (C. L. KOCH) BY A FLY OF THE GENUS *EXETASIS* (DIPTERA, ACROCERIDAE) IN BRAZIL.

VERA REGINA D. von EICKSTEDT
(Seção de Artrópodos Peçonhentos, Instituto Butantan)

ABSTRACT: Three cases of parasitism in the Mygalomorph spider *Lasidora klugi* by an acrocerid fly were studied. ACROCERIDAE in their larval phase are known only as internal parasites, developing and evolving inside the host spider. Before emergence, the parasite consumes the greatest part of the host's content, thus killing it. Up to now there is only one described case of parasitism by ACROCERIDAE from Brazil (Vellard, 1934); the parasite however had not been identified by the author. For the first time in the literature a spider genus of the sub-family THERAPHOSINAE is cited as host of these flies.

The parasite insects have been reared by the author up to adulthood and were later sent to Prof. Evert Schlinger (University of California, Berkeley, U.S.A.) who identified them as a new species of the genus *Exetasis*, to be described elsewhere.

UNITERMS: Spider parasitism; *Lasiodora klugi* parasitism; Parasite flies; ACROCERIDAE flies; *Exetasis* flies.

INTRODUCTION

Instances of parasitism of spiders by acrocerids have been know for about one century. The oldest reference is by Menge (1866), who in his monograph of Prussian spiders stated to have reared a larva of *Ogcodes pallipes* Erichson from *Clubiona putris* Koch (CLUBIONIDAE). ACROCERIDAE in their larval phase are known only as internal parasites of spiders. The fecundated female lays masses of eggs over the ground, on twigs, on living or dead branches of shrubs and trees. After an incubation of several weeks, the tiny (some tenths of a millimeter long) but quite active larvae, known as planidia, emerge. They may remain standing erect beside their egg shell or may walk worm-like or jump from one place to the other in order to attach themselves to a suitable host which they may encounter. They enter the host by means of a piercing organ present on the head of the larva, which they use to tear the thin intersegmental membranes of the spider's legs.

Address:
C.P. 65, São Paulo, Brazil

Otherwise, they may use the natural orifices of the spider, such as the respiratory or genital slits, without lacerating the host's integument (Millot, 1938). According to Schlinger (1960) several larvae of *Ogcodes* were seen to enter the host through the intersegmental membranes of the legs but 50% of them seemed to prefer entering the spider through the dorsofrontal region of the abdomen. They develop, molt twice and change morphologically inside the host's body. When mature, the larvae emerge from the spider through the abdominal region, usually piercing it (Schlinger, 1952) or (according to Eason *et al.* (1967) for one larva of *Ogcodes pallidipennis* which was seen emerging from one of the lung slits of a female *Pardosa lapidicina*) emerges without damaging its abdomen.

The third larval stage, shortly before emergence, consumes the greatest part of the host contents, thus killing it. The larva, at this phase, is yellowish-white and its body is covered by a glossy, vicous substance. A short time before the emergence of the parasite, the spider, probably stimulated by the movements of the larva in its entrails, spins an irregular web of silken threads, similar to a pre-moulting web (Schlinger, 1962). This is the first sign that something anormal is going to happen.

According to most authors, not until this moment it is possible to know whether the spider is parasitired or not — it does not show any external evidence of parasitism, neither by changes of the body (the increased abdomen might well be mistaken as gravidity or overfeeding) nor by behavioral changes. This irregular web spun by the spider is the place where the larva will fix itself for pupation. It adheres to the silken threads by means of the oral hooks and a series of tiny groups of abdominal hook-like setae, with the head turned upwards. The larva then becomes motionless and gradually darkens. After some days or weeks, the delicate pupal skin starts to break, and the imago emerges. Near the web there can be found the remains of the spider's body, reminding one more of an exuvia than that of the body of a spider.

There are, up to present, only two cases dealing with the biology of acrocerids from the neotropical region: that of Schlinger (1968) who reared *Arrynchus maculatus* Schlinger from the chilean Theraphosid *Phrixotrichus roseus* (Guerin) and that of Vellard (1934) on a *Grammostola actaeon* (Pocock) from Paraná, Brazil, parasitized by a larva that, according to Vellard "présente tous les caractères des *Ochaea;* ce n'est ni l' *O. calida* Wied, ni l' *O. lugubris* Gerst; je n'ai pu me procurer actuellement la description des deux autres espèces de ce genre décrites au Brésil".

The Seção de Artrópodos Peçonhentos of the Instituto Butantan in São Paulo receives every year hundreds of specimens of living Mygalomorph spiders (tarantulas or "caranguejeiras" in Brazil) from the most diverse regions of the country. These specimens are sent by people willing to learn something about their peculiarities, by persons aware of their importance to public health, who became our assiduous collaborators, or are obtained during the excursions of the Instituto Butantan staff. Among some of these spiders I had the opportunity to observe three cases of parasitism of *Lasiodora klugi* (MYGALOMORPHAE: THERAPHOSIDAE) by acrocerid flies of the genus *Exetasis* (= *Ocnaea* of authors but *not* Walker, 1852).

Most of the published records of endoparasitism by acrocerids published up

to present involve true spiders (LABIDOGNATHA), especially of the families LYCOSIDAE and SALTICIDAE. Few cases were recorded in Mygalomorph spiders of the family CTENIZIDAE (Brauer, 1869; Jenks, 1938) and THERAPHOSIDAE (Baerg, 1958; Eason *et al.*, 1967 and Schlinger, 1968). Among the THERAPHOSINAE, no instance of parasitism has been published prior to this note. Besides this, the cases of parasitism by ACROCERIDAE in Mygalomorph spiders described up to now, involved only fossorial genera. Therefore, this account on parasitism of a nomadic THERAPHOSINAE, may be of interest to entomologists and biologists in general.

MATERIAL AND METHODS

At arrival in the lab the spiders are identified and then put inside wooden cages. Each cage has a number and a corresponding slip of paper, where there are recorded: classification, sex, origin and arrival date of the spider, name and address of the collector. The spiders are checked regularly and observations on shedding, making of cocoons, birth of spiderlings, changes in behavior, feeding, etc. are recorded.

The cages measure 30x25x20 cm., the back wall is of wire screen and the front is a glass sliding door. This way, cleaning, treatment and observation of the spider are easily done. The several cages (about 400) are arranged by numerical order in special shelves, one next to the other in a rearing room. During hot weather the animals are kept at room temperature, during cold weather the room is heated to 23°C. Every two or three weeks the spiders are fed with a live baby mice. The water they are supposed to drink is kept in little clay containers and renewed constantly; the water never must be missing in the cage.

The hosts have been identified by the author and the acrocerid parasites by Prof. Evert Schlinger (University of California, Berkeley, U.S.A.) who concluded that these ACROCERIDAE represent a new species of *Exetasis* which he intends to describe. The drawings were done with a camera lucida by Mrs. Delma Travassos. The exact time of emergence from the host and eclosion of the adults were recorded, but not the precise dates of pupation.

BIOLOGICAL DATA

First case: On December 26, 1967, we have received a specimen of *Lasiodora klugi,* sent by the company "Sul Madeiras, Ltda". The spider had been captured when trying to escape from a log of rosewood (jacarandk) from Bahia, Brazil. On January 26, 1968, the spider moulted in the laboratory and on June 26 of the same year was found dead inside its cage. The body was almost empty and showed in the dorsum of the abdomen, near the base, two orifices. Inside the cage two yellowish-white larvae were found, and were preserved in 70% alcohol for study. They will be described by Schlinger. Their collection number is N.° 310, IB. The host, unfortunately, was not preserved.

2nd. case: On February 16, 1968, the Company Masul S. A., Osasco, sent us six specimens of *Lasiodora klugi*, found in a load of logs from Colatina, State of Espírito Santo, Brazil. Three specimens were already dead at the time arrival, and were included in the arachnological collection of the Seção de Artrópodos Peçonhentos of the Instituto Butantan (N.° 3845 IB). Of the three remaining specimens, one was a male which died on February 24, 1970, and was not parasi-

tized; the second, a female, is still alive; the third, an immature specimen, was parasitized by two larvae, which emerged on July 5, 1968, causing the death of the spider (preserved under N.º 28, IB). The larvae were reared. At the time of emergence, the larvae had a whitish color, with a slight greenish tinge. On July 25, 1968, the pupae had already formed, with a yellowish-brown coloration, and hung from the irregular web spun by the spider (Photograph 1). On September 2, 1968, one of the imagos had freed itself almost completely from the puparium, the wings and legs plainly visible. On September 9, 1968, it walked about the cage, very slowly, dying a few days afterwards (the exact date was not recorded). The host was a juvenile female spider, with the genital slit still closed.

3rd. case: An immature specimen of *Lasiodora klugi*, without procedence, arrived at the Instituto Butantan on December 11, 1967. On February 20, 1969 shedding took place and on July 10, 1969, it was found dead in the cage. Near its body, were two shining larvae each with eight dark ventral spots (setal platelets). One larva was found dead the following day, but the other was reared to an adult. On July, 1969, the pupa was already formed and its skin contained a gap near the region of the head (prothoracic gap). On July 15, 1969, the pupa had a much darker color, practically grey; the gap reached the median region of the body. On August 12, 1969, the adult emerged, and the puparium had at this time a blackish color. Two days later the adult was found dead, being preserved together with the remmants of the host (N.º 3955, IB). The host was an immature female, with the genital slit closed and the spermathecae still in process of formation.

CONCLUSIONS

1. Contrary to the observations of several authors dealing with north temperate spiders, emergence of these brazilian parasites occurred during the winter. One possible explanation is that the spiders were kept under laboratory conditions, in heated rooms during the winter. It is possible that, if the spiders were kept under natural conditions of temperature, the parasites would have emerged later.

2. In all three cases two larvae per host emerged. In one of the cases (2nd.) it seems that the second larva used the same hole as the first did, for no other exit hole was found. Other cases of double or multiple parasitism by acrocerids are those of Jenks (1938), Baerg (1958), Eason *et al.* (1967), and Montgomery (1903).

3. It was always possible to see the exact site of fixation of the larvae near the edge of the exit hole (Fig. 1 and 2). In that region a small chitinized shell (spiracular plate) was observed containing the spiracular remnants of the second-instar larva. In case 2, the region of fixation of the larva which used the same exit hole as the first, could be seen very clearly: simmetrically to this exit hole there was a slightly modified integument region with the two second-instar larval caudal spiracles at the center. Millot (1938) cites an analogous fact for *Ogcodes* in the abdomen of a *Clubiona* but this is the first time that an illustration is given of these structures. Thus, contrary to most author's statements that the detection of parasitism can be done only just prior to the emergence of the larva, an accurate examination of the spider integument would have revealed much earlier this fact, at least in our three specimens.

von EICKSTEDT, V. R. D. — Three cases of parasitism in the Mygalomorph spider LASIODORA KLUGI (C. L. KOCH) by a fly of the genus EXETASIS (DIPTERA ACROCERIDAE) in Brazil. *Mem. Inst. Butantan*, 35: 139-146 1971.

4. The time of development of the larvae could not be determined, since the spiders received were already parasitized. However, we could observe that from arrival to emergence of the larvae, periods between 139 and 577 days elapsed The larvae needed from 33 to 66 days from host emergence to adulthood.

RESUMO — Foram estudados três casos de parasitismo entre a aranha caranguejeira *Lasiodora klugi* e uma espécie nova de môsca do gênero *Exetasis* (ACROCERIDAE). Os acrocerídeos na sua fase larval são sempre parasitas internos de aranhas, desenvolvendo-se e transformando-se profundamente no interior delas. Antes de emergirem do hospedeiro, consomem a maior parte do seu conteúdo interno, matando-o.

Existia até agora sòmente um caso relatado sôbre a biologia de ACROCERIDAE do Brasil (Vellard, 1934) onde, porém, o autor não chega a identificar o parasita. Pela primeira vez na literatura, um gênero de aranha da sub-família THERAPHOSINAE é citado como hospedeiro dessas môscas.

Os insetos parasitas foram criados pelo autor até a fase adulta e, posteriormente, enviados ao Prof. Evert Schlinger (University of California, Berkeley, U.S.A.) que os identificou como espécie nova do gênero *Exetasis*, que êle irá descrever.

UNITERMOS: Parasitismo em aranhas; Parasitismo em *Lasiodora klugi*; Dípteros parasitas de aranhas.

ACKNOWLEDGEMENTS

My best thanks are due to Prof. Evert Schlinger (Department of Entomology, University of California, Berkeley) for reviewing the manuscript and making the identification and description of the new species of ACROCERIDAE and to Mr. Nelson Papavero (Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo) for many suggestions.

TABLE 1: BIOLOGICAL DATA

HOST			PARASITE			
N.º	sex	caged on	emergence	larval* period	adult	from emergence to imago
310 IB	♀	26.XII.1967	26.VI.1968	180	....	....
28 IB	♀	16.II.1968	5.VII.1968	139	2.IX.1968	60 days
3955 IB	♀	11.XII.1967	10.VII.1969	577	12.VIII.1969	33 days

* larval period (inside the host) recorded only in the lab. (in days).

von EICKSTEDT, V. R. D. — Three cases of parasitism in the Mygalomorph spider LASIODORA (*ORTHOGNATHA*) estabelecidos por C. de Mello Leitão e depositados no Museu Nacional do Rio. *Mem. Inst. Butantan,* 35: 139-146. 1971.

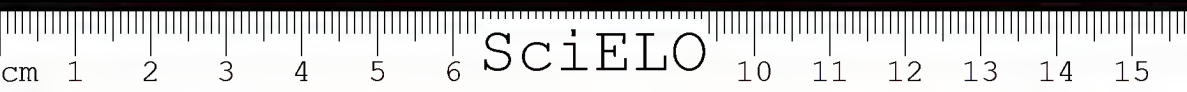
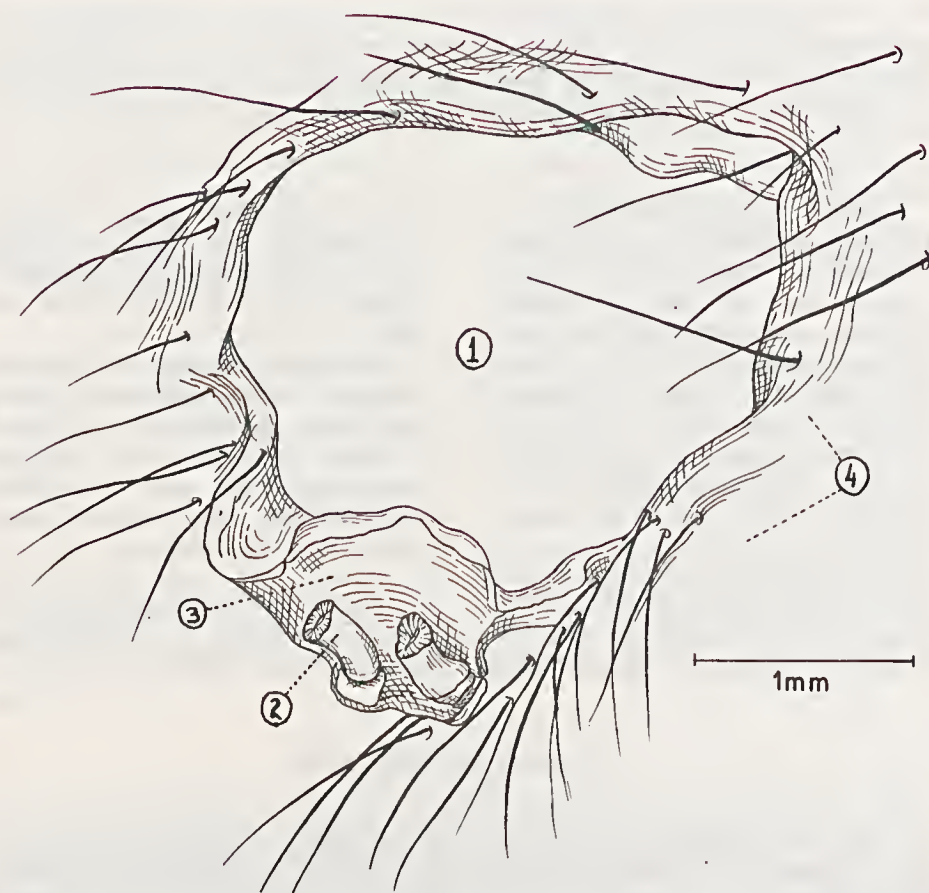



Fig. 1: Emergence hole of an *Exetasis* sp. larva showing: 1) emergence hole 2) spiracular remnants seen from inside 3) spiracular plate seen from inside 4) spider's integument with its setae

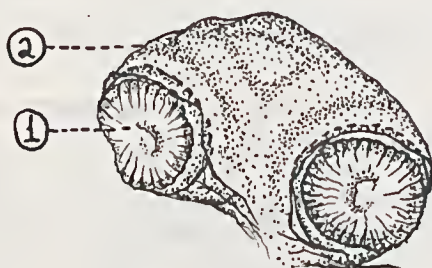



Fig. 2: Region of fixation of an *Exetasis* sp. larva in the abdominal spider integument showing: 1) caudal spiracles of the larva 2) spiracular plate seen from outside.

Photograph 1: Pupae of *Exetasis* sp. hanging from the web spun by *Lasiodora klugi*.

von EICKSTEDT, V. R. D. — Three cases of parasitism in the Mygalomorph spider LASIODORA KLUGI (C. L. KOCH) by a fly of the genus EXETASIS (DIPTERA ACROCERIDAE) in Brazil. *Mem. Inst. Butantan*, 35: 139-146 1971.

REFERENCES

1. BAERG, W. J. — The tarantula. Lawrence, Kansas vii+1-88, 19 illustr., 1958.

2. BRAUER, F. — Beschreibung der Verhandlungsgeschichte der *Mantispa styriaca* Poda und Betrachtung über die sogenannte Hypermetamorphose Fabres, *Verh. zool.-bot. Ges. Wien*, **19**:737-740, 1869.

3. EASON, F. R., W. B. PECK and W. H. WHITCOMB — Notes on spider parasites, including a reference list, *J. Kansas Ent. Soc.*, **40**(3):422-434, 1967.

4. JENKS, G. E. — Marvels of metamorphosis, *Nat. Geogr. Mag.*, **74**(6):807-828, 1938.

5. KASTON, B. J. — Notes on dipterous parasites of spiders, *J. N. York Ent. Soc.*, **45**(3,4):415-420, 1937.

6. MENGE, A. — Preussische Spinnen, *Schr. Naturf. Ges. Danzig*, **1**(4):37-38, 1866.

7. MILLOT, J. — Le dévelopement et la biologie larvaire des ONCODIDAE (CYRTIDAE) diptères parasites d'Araignées, *Bull. Soc. Zool. France*, **63**:161-197, 1938.

8. MONTGOMERY, T. H. — Studies on the habits of spiders, particularly those of the mating period. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philad.*, **55**:51-149, 1903.

9. SABROSKY, C. W. — A further contribution to the classification of North American spider parasites of the family ACROCERIDAE, *Amer. Midland Nat.*, **39**(2):382-440, 1948.

10. SCHLINGER, E. I. — The emergence, feeding habits, and host of *Opsebius diligens* Osten Sacken (DIPTERA: ACROCERIDAE), *Pan-Pac. Ent.*, **28**(1):7-12, 1952.

11. SCHLINGER, E. I. — A revision of the genus *Ogcodes* Latreille, with particular reference to species of the western hemisphere, *Proc. U. S. Nat. Mus.*, **111**:227-336, 1960.

12. SCHLINGER, E. I. — Studies of Neotropical ACROCERIDAE, Part I. A revision of *Arrynchus* Philippi and a key to the genera of the *Ocnaea* branch of the PANOPINAE (DIPTERA), *Rev. Chilena Ent.*, **6**:47-54, 1968.

13. WALKER, F. — DIPTERA, Vol. I, *In* Insecta Saundersiana, W. W. Saunders Ed., London, "1856", pp. 202-203, 1852.

14. VELLARD, J. — Une larve de diptère parasite d'une Mygale, *C. R. Soc. Biol.* Paris, **115**:77-78, 1934.

15. VELLARD, J. — Notes sur quelques parasites de Mygales sud-americaines, *Bull. Soc. Zool. France*, **59**:293-295, 1934.

Recebido para publicação em 19 de novembro de 1971.

Mem. Inst. Butantan
35: 147-155, 1971.

β-OXO N-SUBSTITUTED BENZAZOLES. I — THE β-ACYLETHYLATION OF BENZIMIDAZOLES WITH MANNICH BASES **

RAYMOND ZELNIK and FATIMA STREHLAU
(Serviço de Química Orgânica, Instituto Butantan)

ABSTRACT: Benzimidazoles and tertiary ketonic Mannich Bases react in ethanol at reflux temperature to yield β-oxo N-substituted benzimidazoles. Reduction with $NaBH_4$ afforded the corresponding λ-hydroxy N-substituted derivatives. Some biological data are reported.

UNITERMS: Benzimidazole, Alcoylation with Mannich Bases; Michael addition.

The discovery of the inhibitory action of benzimidazole against a number of microorganisms, a process antagonized by certain purines (13) and evidence henceforth of biological activity associated with the benzimidazole nucleus have resulted in the description of a wide variety of physiologically active substances. These include analgetic (6), antibacterial (1), central depressant (4) and antiviral (10) agents.

In continuation of our studies on β-oxo N-substituted theophyllines (14) which involved the reaction of β-acylethylation with tertiary ketonic Mannich Bases (5), it seemed pertinent to extend this reaction to benzimidazole (15), and to 2-substituted benzimidazoles in order to provide new compounds for chemotherapeutical evaluation.

As in the mechanism frequently proposed (3), the over-all reaction, eq. [1], is likely to proceed by elimination of the dialkylamine, eq. [2], followed by a classical Michael addtion of the benzimidazole to the α, β-unsaturated ketone, eq. [3], generated *in situ*.

---

* Investigação realizada sob os auspícios do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e do Conselho Nacional de Pesquisas.

** Parte da tese de doutoramento de F.S., Universidade de São Paulo, 1967.

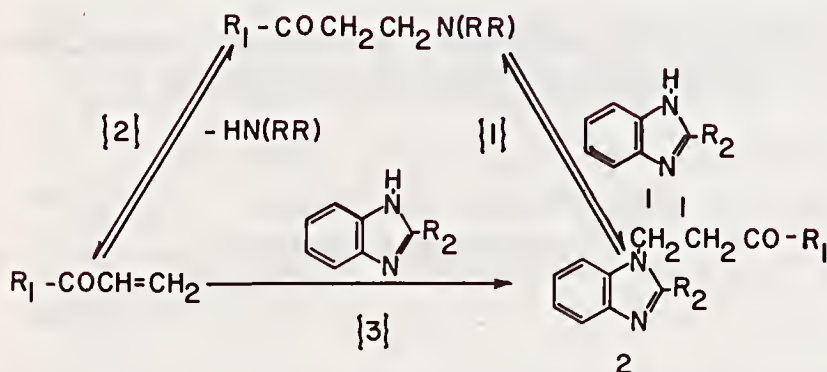
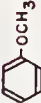
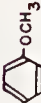
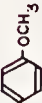
Adress: C.P. 65 — São Paulo, Brazil.

$R_1-COCH_2CH_2N(RR)$

{2} $-HN(RR)$ {1}

$R_1-COCH=CH_2$ {3}

$CH_2CH_2CO-R_1$

2

Benzimidazoles and the appropriate tertiary ketonic Mannich Bases were made to react in ethanol under reflux. The reaction was followed by observation of the elimination of the volatile amine under a stream of nitrogen and also by TLC when aliquots were analysed at intervals. The benzimidazoles were obtained by the Phillips condensation (11) of o-phenylenediamine with organic acids. The Mannich Bases were prepared and stocked in the form of their hydrochlorides and according to need transformed with the help of cold alkali into the base which was taken up in ether and used as a residual oil without further purification.

After completion of the reaction between the benzimidazole and the Mannich Base, concentration or cooling of the solution afforded the product in a crystalline form. In other cases when it was contaminated with the starting material or resisted crystallization, isolation of the product was accomplished by way of chromatography. Under these conditions, the desired β-oxo N-substituted benzimidazoles were obtained in yields ranging from 37 to 74% as recorded in Table I.

As previously reported (15), the Michael addition according to eq. [3] was effected when benzimidazole and phenyl-vinyl ketone were heated under reflux in toluene in presence of Triton B as a catalyst. The resulting product of condensation was identical to the corresponding compound (I, Table I) obtained under the preceding conditions.

The new benzimidazoles were readily reduced to the corresponding secondary alcohols by $NaBH_4$ with excellent yields as show in Table II, to constitute a pool of starting materials for further synthesis.

ZELNIK, R. and STREHLAU, F. — β-oxo N-substituted benzazoles. I — The β-acylethylation of benzimidazoles with Mannich Bases. *Mem. Inst. Butantan.* 35: 147-155, 1971.

TABLE I

β-OXO N-SUBSTITUTED BENZIMIDAZOLES *

COMPOUND	A	R	TIME OF REACTION (H)	MELTING POINT (°C)	% YIELD
I	$-CH_2CO-C_6H_5$	H	16	129-131	65
II	2-oxocyclohexyl	H	40	83-87	37
III	$-CH_2CO-CH=CH-C_6H_4-OCH_3$	H	32	136-138	70
IV	$-CH_2CO-CH=CH-C_6H_5$	H	20	128-130	61
V	$-CH_2CO-C_6H_5$	CH_3	79	97-99	40
VI	$-CH_2CO-CH=CH-C_6H_4-OCH_3$	CH_3	110	100-102	68
VII	$-CH_2CO-C_6H_5$	$CHOH-CH_3$	134	134-135	74
VIII	$-CH_2CO-CH=CH-C_6H_4-OCH_3$	$CHOH-CH_3$	120	123-125	37
IX	$-CH_2CO-C_6H_5$	$CHOH-C_6H_5$	235	158-160	60
X	$-CH_2CO-CH=CH-C_6H_4-OCH_3$	$CHOH-C_6H_5$	176	168-170	55

*COMPOUNDS OF STRUCTURE

CH_2-A

ZELNIK, R. and STREHLAU, F. — β-oxo N-substituted benzazoles. I — The β-acylethylation of benzimidazoles with Mannich Bases. *Mem. Inst. Butantan.* 35: 147-155, 1971.

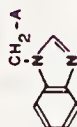



TABLE II

γ-HYDROXY N-SUBSTITUTED BENZIMIDAZOLES *

COMPOUND	R_1	R	MELTING POINT (°C)	% YIELD	FORMULA	%C CALCD. / FOUND	%H CALCD. / FOUND	%N CALCD. / FOUND
XI	C_6H_5-	H	126–128	90	$C_{16}H_{16}N_2O$	76.19	6.38	11.10
						76.46	6.44	11.35
XII	-CH=CH-C_6H_4-OCH_3	H	136–137	90	$C_{19}H_{20}N_2O_2$	74.00	6.53	9.08
						74.20	6.82	9.14
XIII	-CH=CH-C_6H_5	H	106–108	60	$C_{18}H_{18}N_2O$	77.67	6.51	10.05
						77.80	6.54	10.02
XIV	C_6H_5-	CH_3	138–140	80	$C_{17}H_{18}N_2O$	76.66	6.81	10.52
						76.33	6.80	10.61
XV	-CH=CH-C_6H_4-OCH_3	CH_3	156–159	77	$C_{20}H_{22}N_2O_2$	74.51	6.87	8.68
						74.40	6.87	8.79
XVI	C_6H_5-	CHOH-CH_3	74–76	82	$C_{18}H_{20}N_2O_2$	72.95	6.79	9.45
						73.22	6.90	9,39
XVII	-CH=CH-C_6H_4-OCH_3	CHOH-CH_3	126–128	80	$C_{21}H_{24}N_2O_3$ **	69.79	6.96	7.75
						70.37	6.92	7.83
XVIII	C_6H_5-	CHOH-C_6H_5	196–198	95	$C_{23}H_{22}N_2O_2$	77.07	6.18	7.81
						76.96	6.21	7.86
XIX	-CH=CH-C_6H_4-OCH_3	CHOH-C_6H_5	167–168	60	$C_{26}H_{26}N_2O_3$	75.34	6.32	6.76
						75.44	6.27	6.78

* COMPOUNDS OF STRUCTURE $CH_2CH_2CHOH-R_1$ (on N) with R at position 2

** CALCD. WITH 0.5 MOLE OF H_2O.

BIOLOGICAL ACTIVITIES

The compounds described in Table I were evaluated for their anti-tumor activities: in the *in vivo* tests with mouse transplanted tumors *Mecca lymphosarcoma* and *Ridgway osteogenic sarcoma,* no reproducible activities were found. However, compounds I and V displayed some indicative features in retardation of *ROS* tumor growth at doses of 500 and 125 mg/kg/day respectively.

In the tests for anti-malarial and anti-schistosomiasis activities, all the compounds were inactive in mice infected with *Plasmodium berghei* or with *Schistosoma mansoni.*

The compounds were also tested in the supramaximal electroshock for potential antiepileptic properties: only compound VI displayed some anticonvulsant activity.

EXPERIMENTAL

Melting points were taken on a Kofler-Reichert hot stage microscope and are uncorrected. The infra-red spectra were measured in KBr discs on the Unicam SP-200 spectrophotometer Chromatography was carried out on silicic acid (Merck 0.05 — 0.20 mm) and thin-layer chromatography on plates coated with Silicagel G (Merck). Spots were detected with ultraviolet light or iodine vapour.

Analyses were performed by the microanalytical laboratory, Pharmazeutisches Institut der Universität, Basel. We express our thanks to Professor Kuno Meyer for this courtesy.

Percent yields and time of reactions are listed in Table I and Table II.

3-(1-benzimidazolyl)-propiophenone (1)

A mixture of benzimidazole (2.36 g, 0.02 mole) and β-dimethylamino-propiophenone (8) in ethanol (50 ml) was heated under reflux. Upon concentration of the solvent, the precipitate was filtered and recrystallized from acetone-petrol ether b.p.35-80°, to give 3.23 g of the product, m.p.129-131°.

μ_{max} 1670 cm^{-1} (C=O).

Anal. Calcd. for $C_{16}H_{14}N_2O$: C, 76.78; H, 5.64; N, 11.20.
Found: C, 76.53; H, 5.48; N, 11.19.

2-(1-benzimidazolylmethyl)-cyclohexanone (II)

Benzimidazole (9.4 g, 0.08 mole) and 2-dimethylaminomethyl-cyclohexanone (7) (12 g, 0.08 mole) in 75 ml of ethanol were refluxed. The solvent was evaporated and the viscous residue chromatographed. The elutions from benzene-chloroform 3:1 and 1:1 furnished 6.18 g of the product which crystallized from benzene-petrol ether, m.p.83-87°.

μ_{max} 1705 cm^{-1} (C=O).

Anal. Calcd. for $C_{14}H_{16}N_2O$: C, 73.65; H, 7.06; N, 12.27.
Found: C, 73.55; H, 7.11; N, 12.53.

5-(1-benzimidazolyl)-1-(p-methoxyphenyl)-1-penten-3-one (III)

A mixture of benzimidazole (14 g, 0.12 mole) and 5-dimethyl-amino-1--(p-methoxyphenyl)-1-penten-3-one (9) (35 g, 0.15 mole) in 100 ml of ethanol was heated under reflux. Upon concentration and cooling, the precipitate was collected and crystallized from acetone-ether, yield 26 g, m.p. 136-138°.

μ_{max} 1685 cm^{-1} (C=O).

Anal. Calcd. for $C_{19}H_{18}N_2O_2$: C, 74.49; H, 5.92; N, 9.15. Found: C, 74.68; H, 5.98; N, 8.85.

5-(1-benzimidazolyl)-1-phenyl-1-penten-3-one (IV)

Benzimodazole (0.59 g, 0.005 mole) and 5-dimethylamino-1-phenyl-1--penten-3-one (9) (1.26 g, 0.006 mole) in 20 ml ethanol were heated under reflux. Upon concentration, the solid residue crystallized from acetone-ether, yield 0.66 g of the product, m.p. 128-130°.

μ_{max} 1660 cm^{-1} (C=O).

Anal. Calcd. for $C_{18}H_{16}N_2O$: C, 78.23; H, 5.84; N, 10.14. Found: C, 78.31; H, 5.99; N, 10.34.

3-[1-(2-methylbenzimidazolyl)]-propiophenone (V)

A mixture of 2-methyl-benzimidazole (12) (19.8 g, 0.15 mole) and β-dimethylaminopropiophenone (26 g, 0.15 mole) in ethanol (90 ml) was heated under reflux. Upon concentration, the solid residue crystallized from acetone--ether, yield 15.9 g of the product, m.p. 97-99°.

μ_{max} 1675 cm^{-1} (C=O).

Anal. Calcd. for $C_{17}H_{16}N_2O$: C, 77.23; H, 6.09; N, 10.61. Found: C, 77.28; H, 6.26; N, 10.45.

Oxime, m.p. 213-215°. Anal. Calcd. for $C_{17}H_{17}N_3O$: C, 73.08; H, 6.13. Found: C, 72.81; H, 5.83.

5-[1-(2-methylbenzimidazolyl)]-1-(methoxyphenyl)-1-penten-3-one (VI)

2-methyl-benzimidazole (13.2 g, 0.1 mole) and 5-dimethyl-amino-1-(p-methoxyphenyl)-1-penten-3-one (30 g, 0.14 mole) in 75 ml of ehanol were heated under reflux. After distilling off the solvent, the viscous residue was chromatographed and the elutions from benzene-chloform 1:1 and chloroform yielded 22 g of the product which crystallized from acetone-ether, m.p. 100-102°.

μ_{max} 1680 cm^{-1} (C=O).

Anal. Calcd. for $C_{20}H_{20}N_2O_2$: C, 74.97; H, 6.29; N, 8.74.
Found: C, 75.09; H, 6.36; N, 8.89.

3-[1-(2-α-hydroxyethylbenzimidazolyl)]-propiophenone (VII)

2-α-hydroxyethyl-benzimidazole (12) (5 g, 0.037 mole) and β-dymethylaminopropiophenone (8.5 g, 0.048 mole) were refluxed in ethanol (60 ml). On cooling the product which precipitated was contaminated by the starting material and attempts to purify it by recrystallizations failed as shown by t.l.c. It was therefore chromatographed and the elutions from chloroform-acetone 5:1 gave 8.1 g of the product which was crystallized from acetone-petrol ether, m.p. 134-135°.

μ_{max} 1675 cm^{-1} (C=0).

Anal. Calcd. for $C_{18}H_{18}N_2O_2$: C, 73.45; H, 6.16; N, 9.52.
Found: C, 73.61; H, 6.12; N, 9.61.

Oxime, m.p. 185-186°. Anal. Calcd. for $C_{18}H_{19}N_3O_2$: N, 13.58.
Found: N, 13.41.

5-[1-(2-α-hydroxyethylbenzimidazolyl)]-1-(methoxyphenyl)-1-penten-3-one (VIII)

A mixture of 2-α-hydroxyethyl-benzimidazole (8 g, 0.05 mole) and 5-dimethylamino-1-(p-methoxyphenyl)-1-penten-3-one (15 g, 0.065 mole) in 90 ml of ethanol was heated under reflux The solvent was taken to dryness and the viscous residue was chromatographed. The elutions from benzene-chloroform 1:2 and chloroform gave 6.5 g of the product which crystallized from acetone-ether, m.p. 123-125°.

μ_{max} 1650 cm^{-1} (C=O)

Anal. Calcd. for $C_{21}H_{22}N_2O_3$: C, 71.98; H, 6.32; N, 7.99.
Found: C, 72.03; H, 6.42; N, 8.10.

3-[1-(2-α-hydroxybenzylbenzimidazolyl)]-propriophenone (IX)

A mixture of 2-α-hydroxybenzyl-benzimidazole (11) (22.4 g, 0.10 mole) and β-dimethylaminopropiophenone (22.2 g, 0.12 mole) in 100 ml of ethanol was heated under reflux. Upon concentration the precipitate was collected and separated from contaminants by chromatography. The elutions from chloroform afforded 21.4 g of the product which crystallized from acetone-petrol ether, m.p. 158-160°.

μ_{max} 1675 cm^{-1} (C=O).

Anal Calcd. for $C_{23}H_{20}N_2O_2$: C, 77.50; H, 5.66; N, 7.86.
Found: C, 77.46; H, 5.78; N, 7.97.

5-[1-(2-α-hydroxybenzylbenzimidazolyl] -1-(p-methoxyphenyl)-1-penten--3-one (X)

A mixture of 2-α-hydroxybenzyl-benzimidazole (9.3 g, 0.04 mole) and 5-dimethylamino-(p-methoxyphenyl)-1-penten-3-one (12.5 g, 0.05 mole) in 80 ml of ethanol was heated under reflux. Upon concentration of the solvent, the solid residue was collected and recrystallized from chloroform-acetone, yield 9.5 g, m.p. 168-170°.

μ_{max} 1680 cm^{-1} (C=O).

Anal. Calcd for $C_{26}H_{24}N_2O_3$: C, 75.71; H, 5.86; N, 6.79. Found: C, 75.45; H, 6.12; N, 6.81%.

$NaBH_4$ reduction of the 3-oxo N-substituted benzimidazoles

The λ-hydroxy N-aralkylbenzimidazoles were obtained when $NaBH_4$ was added to a solution of the keto derivatives (0.02 mole) in methanol (25 ml) and the mixture stirred at room temperature for 1 h.After neutralisation with acetic acid, evaporation of the solvent and dilution with water, the product precipitated. It was then collected, dried and recrystallized from acetone-ether. Table II lists the analytical data and physical constants of the alcohols.

SUMÁRIO: Benzimidazois N-substituidos por uma cadeia β-oxo-aralquila foram sintetizados por aciletilação de diversos benzimidazois com Bases cetônicas de Mannich. A redução pelo $NaBH_4$ forneceu os compostos λ-hidróxi correspondentes. Algumas atividades biológicas são comentadas.

UNITERMOS: Benzimidazol; alcoilação com Bases de Mannich; Reação de Michael.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Drs. C. Chester Stock and Georges S. Tarnowski, Division of Experimental Chemotherapy of the Sloan-Kettering Institute for Cancer Research (New York) for the anti-tumor assays and interpretation of the results, to Dr. J. Pellegrino, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte) for the anti-schistosomiasis tests, to Dr. Z. Brener, Instituto Nacional de Endemias Rurais (Belo Horizonte) for the anti-malarial tests and to Dr. H. Edery, Israel Institute for Biological Research (Ness-Ziona) for the electroshock evaluations. One of us (FS) express her thanks to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, for the award of a doctoral fellowship. The technical assistence of Miss Rita Kuribara, Mrs. Kazuko Kajibata Gaeta and Mr. Alipio Raul da Silva is appreciated.

ERRATA

Pg.151 a 154 - for α *read* ϑ

Pg.151 a 154 - for λ *read* γ

Pg.154 - for 3 *read* β

ZELNIK, R. and STREHLAU, F. — β-oxo N-subst tuted benzazoles. I — The β-acylethylation of benzimidazoles with Mannich Bases. *Mem. Inst. Butantan.* 35: 147-155, 1971.

REFERENCES

1 — BISHOP, B. C., CHELTON, E. T. J. and JONES, A. S. — *Biochem. Pharmacol,* **13**: 751, 1964.

2 — BISTRYCKI, A. und PRZENWORSKI, G. — *Ber. dtsch. chem. Ges,* **45**: 3483, 1912.

3 — BREWSTER, J. H. and ELIEL, E. L. — *Organic Reactions,* John Wiley, New York, 1953, vol. 7, pg. 99; BROWN, H. L.; BUCHANAN, G. L.; CURRAN, A. C. W. and McLAY, G. W. — *Tetrahedron,* **24**: 4565, 1968.

4 — De STEVENS, G.; BROWN, A. B.; ROSE, D.; CHERNOV, H. I. and PLUMMER, A. J. — *J. Med. Chem.* **10**: 211, 1967.

5 — GILL, N. S.; JAMES, K. B.; LIONS, F. and POTTS, K. T., *J. Amer. chem. Soc.,* **74**: 4923, 1952.

6 — HUNGER, A.; KEBRLE, L.; ROSSI, A. and HOFMANN, K. — *Experientia,* **13**: 400, 1957.

7 — MANNICH, C. und BRAUN, R. — *Ber. dtsch. chem. Ges.,* **53**: 1874, 1920.

8 — MANNICH und HEILNER, G. — *Ber. dtsch. chem. Ges.,* **55**: 356, 1922.

9 — NISBET, H. B. — *J. chem. Soc.,* 1237, 1938.

10 — O'SULLIVAN, D. G.; PANTIC, D. and WALLIS, A. K. — *Experientia, 23:* 704, 1967; BUCKNALL, R. A., *J. gen. Virol.,* **1**: 89, 1967.

11 — PHILLIPS, M. A. — *J. chem. Soc.* 2393, 1928.

12 — WAGNER, E. C. — *J. Org. Chem.,* **5**: 133, 1940.

13 — WOOLLEY, D. W. — *J. biol. Chem.,* **152**: 225, 1944.

14 — ZELNIK, R. et PESSON, M. — *Bull. Soc. Chim. France,* 1667, 1959.

15 — ZELNIK, R. and STREHLAU, F. — preliminary communication, *Experientia,* **21**: 617, 1965.

Recebido para publicação em 27 de agôsto de 1971.

ÍNDICE DE AUTORES

ÍNDICE DE ASSUNTOS